

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 15/28, C12P 21/02, 21/08 C12N 5/10, 15/13, A61K 39/395 // (C12P 21/02, C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 WO 93/13133
		(43) 国際公開日 1993年7月8日 (08.07.1993)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/01630 (22) 国際出願日 1992年12月15日 (15. 12. 92)		(74) 代理人 弁理士 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.) 〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 812111 1991年12月20日 (20. 12. 91) US 895952 1992年6月9日 (09. 06. 92) US 944159 1992年9月11日 (11. 09. 92) US		(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BB, BE (欧州特許), BF (OAPI 特許), BG, BJ (OAPI 特許), BR, CA, CF (OAPI 特許), CG (OAPI 特許), CH (欧州特許), CI (OAPI 特許), CM (OAPI 特許), CS, DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FI, FR (欧州特許), GA (OAPI 特許), GB (欧州特許), GN (OAPI 特許), GR (欧州特許), HU, IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LK, LU (欧州特許), MC (欧州特許), MG, ML (OAPI 特許), MN, MR (OAPI 特許), MW, NL (欧州特許), NO, NZ, PL, PT (欧州特許), RO, RU, SD, SE (欧州特許), SN (OAPI 特許), TD (OAPI 特許), TG (OAPI 特許), UA.	
(71) 出願人 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 Tokyo, (JP) プロテイン デザイン ラブス, インコーポレイティド (PROTEIN DESIGN LABS, INC.) [US/US] 94043 カリフォルニア マウンテンビュー ガルシアアベニュー 2375 California, (US)		添付公開書類 国際調査報告書	
(72) 発明者 コー マン スン (CO, Man Sung) 95014 カリフォルニア カバティノ ヨシノブレイス 10230 California, (US) ツー ジュー ユン (TSO, J. Yun) 94025 カリフォルニア メンローパーク オークグローブ アベニュー 445 California, (US)			

(54) Title : HUMAN TYPE ANTIBODY REACTIVE WITH GPIIb/IIIa

(54) 発明の名称 GPIIb/IIIaと反応性のヒト型化抗体

(57) Abstract

A human type immunoglobulin which specifically reacts with GPIIb/IIIa protein is produced by employing recombinant DNA technology and is used for treating, for example, various diseases related to thrombus.

(57) 要約

GPIIb/IIIaタンパク質と特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンは組換えDNA技術を使用して製造され、例えば種々の血栓関連疾患の治療に使用される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア  
AU オーストラリア  
BB オバルバードス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コート・ジボアール  
CM カメルーン  
CS チェコスロヴァキア  
CZ チェコ共和国  
DE ドイツ  
DK デンマーク  
FI フィンランド  
ES スペイン

FR フランス  
GA ガボン  
GB イギリス  
GN ギニア  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
IE アイルランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
KZ カザフスタン  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ  
MG マダガスカル  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア

MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア  
RU ロシア連邦  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SK スロヴァキア共和国  
SN セネガル  
SU ソビエト連邦  
TD チャド  
TG トーゴ  
UA ウクライナ  
US 米国  
VN ヴェトナム

## 明 細 書

## G P I I b / I I I a と反応性のヒト型化抗体

## 技術分野

本発明は、新規な生物学的製剤を開発するために組換えDNA技術とモノクローナル抗体技術を組み合わせることに関するものであり、更に詳細には、例えば、G P I I b / I I I a 抗原に特異的な（ヒトにおける）非免疫原性の免疫グロブリンを製造すること並びにそれらをインビトロおよびインビボで使用することに関する。

## 背景技術

心血管疾患は先進国における死亡および疾病の主要原因である。アテローム性動脈硬化または動脈の狭窄および硬化は心血管疾患の主要原因である。動脈血栓症、即ち凝血塊または血栓の形成は通常、特に血管壁上に形成されたプラークに開裂が生じたときアテローム性動脈硬化の影響を受けた動脈で発生する。冠状動脈における血栓形成は、血流遮断が持続する場合には急性心筋梗塞（心臓発作）または血流遮断が一過性である場合には不安定狭心症を引き起こすことがある。脳動脈の血栓は卒中または一過性の虚血性発作を引き起こすことがある。動脈血栓は血小板がタンパク質フィブリンと一緒に凝集して形成される。

糖タンパク質 G P I I b / I I I a は血小板の表面に存在し、そして血小板の凝集に重要な役割を果たす。従って、血栓形成において重要な役割を果たしている（全般的には、Phillips等、Blood 71、831（1988）参照、これは本明細書に参考として組み入れる）。G P I I b / I I I a コンプレックスは、1つまたはそれ以上のジスルフィド結合で結合した大きい（分子量＝125 kDa）鎖と小さい（分子量＝25 kDa）鎖からなる1分子のG P I I b（分子量＝140 kDa）と、1本鎖からなる1分子のG P I I I a（分子量＝105 kDa）とから構成されている。Ca<sup>2+</sup>イオンは、接着分子のインテグリンファミリーの一員であるG P I I b / I I I a のヘテロダイマー構造を維持するために必要である。血小板がトロンビン、アデノシンジホスフェート（ADP）またはエピネフリンのような生理的アゴニストで活性化されるとき、血小板表面のG P I I b / I I I a 分子の構造または環境が変化するので、血小板は血清タン

パク質フィブリノーゲンと結合することができる。フィブリノーゲンは血小板を架橋することによって凝集塊を形成する。GPIIb/IIIa はまた接着性タンパク質であるフィブロネクチン、フォン ビルブラント因子およびビトロネクチンの受容体であるため、損傷を受けた血管の内皮下層に血小板が接着しそして偽足を伸ばす原因となる。

GPIIb/IIIa と結合し、フィブリノーゲンとの結合を阻害する多数のモノクローナル抗体が開発されてきた。これらの抗体にはマウスモノクローナル抗体10E5 (Coller等、J. Clin. Invest. 72, 325 (1983)、マウスモノクローナル抗体AP-2 (Pidard等、J. Biol. Chem. 258, 12582 (1983) およびマウスモノクローナル抗体7E3 (Coller、J. Clin. Invest. 76, 101 (1985) )。これらは本明細書に参考として組み入れる) および本明細書に記載したC4G1が含まれる。フィブリノーゲン結合を阻害することによって、これらの抗体はADPのようなアゴニストに応答してインビトロで血小板の凝集を阻止する。それ故、抗GPIIb/IIIa 抗体は血小板の更なる凝集を防止することによって血栓の形成を阻止することができる。実際に、7E3抗体による治療は、特に組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) と組み合わせて投与するとき、イヌの冠動脈血栓症のモデルにおいて冠動脈の再開通に寄与することが見い出されている (Gold等、Circulation 77, 670 (1988) )。

残念ながら、7E3またはC4G1のような非ヒトモノクローナル抗体の使用はヒトの治療、特に以下で説明するような繰り返して行われる治療法では明白な欠点を有している。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒトでの半減期が短くそしてヒトで使用する時他の重要な免疫グロブリンの機能特性を欠く傾向がある。

恐らく更に重要なことには、非ヒトモノクローナル抗体はヒト患者に注射するときかなりの範囲でヒトに抗原性を示すアミノ酸配列を含んでいる。多数の研究によって、外来抗体の注射後に抗体に対して患者が引き起こす免疫応答が非常に強烈であり、初期治療後の抗体の治療上の有用性を消失させることが示されている。更に、益々多数の種々のマウスまたは他の抗原性のある (ヒトに対して) モノクローナル抗体が種々の疾病を治療するために開発されることが期待されるので、任意の異なる非ヒト抗体による最初のまたは幾つかの治療後に、交差反応性

のため、関係のない療法であってもその後の治療が無効またはそれ自体危険になることさえある。

いわゆる「キメラ抗体」の産生（例えば、ヒト定常領域に結合したマウスの可変領域）が幾らか上記の外来抗体への反応を逃れる事が証明されているが、重要な抗原性の問題は残っている。一般的に、典型的なヒトモノクローナル抗体産生技術を使用して、多くの抗原と同様に GPIIb/IIIa 抗原と反応し、高い親和性をもつヒト免疫グロブリンを産生することは非常に困難であろう。血小板凝集を阻害し、血栓症の治療剤として使用し得るヒト免疫グロブリンは知られていない。同様に、いわゆる「ヒト型化した」または「改変した」抗体を製造するために組換え DNA 技術（例えば、Riechmann 等、Nature 332, 323 (1988) およびヨーロッパ公開特許第 0239400 号参照、これらは本明細書に参考として組み入れる）を使用すると、一部予測できない結合親和性のため、不確かな結果がもたらされる。

かくして、ヒトにおいて実質的に抗原性がなく、治療的処方および他の使用に適する方法で容易に且つ経済的に生産される GPIIb/IIIa 抗原に特異的なヒト型化免疫グロブリンの改良が必要とされている。本発明はこれらや他の必要性を満たすものである。

#### 発明の開示

本発明は、例えば、動脈血栓症に関連したヒト疾患の治療に有用な新規組成物、即ち GPIIb/IIIa 抗原と特異的に結合し得るヒト型化免疫グロブリン含有組成物を提供する。この免疫グロブリンは、少なくとも 1 つの鎖がヒトフレームワーク領域断片に機能的に結合した 1 つまたはそれ以上のマウス相補性決定領域 (CDR) からなる 2 対の L/H 鎖コンプレックスを有することができる。例えば、天然マウスアミノ酸残基を更に有するかまたは有していないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域に導入して約  $10^7 \text{M}^{-1}$  より強い親和性で GPIIb/IIIa 抗原と結合し得るヒト型化免疫グロブリンを産生することができる。これらのヒト型化免疫グロブリンはまた、相補性決定領域を与えるマウスモノクローナル抗体と GPIIb/IIIa の結合を阻害することもできる。

本発明の免疫グロブリンは、結合フラグメントおよび他の誘導体を含めて、ト

ランスフェクトした細胞、好ましくは不死化した真核細胞、例えばミエローマまたはハイブリドーマ細胞での永続的発現により種々の組換えDNA技術で容易に產生させることができる。ヒト型化免疫グロブリンのフレームワーク領域をコードする第1の配列および所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第2の配列セットからなるポリヌクレオチドは合成的にかまたは適当なcDNAとゲノムDNA断片を組み合わせることによって製造することができる。

ヒト型化免疫グロブリンは実質的に純粋な形態で単独で、または血栓に対して活性のある組織プラスミノゲンアクチベーター若しくはアスピリンのような治療剤と一緒に使用することができる。これら化合物は全て、急性心筋梗塞、不安定狭心症、卒中および他の血小板介在疾患の治療に特に有用である。ヒト型化免疫グロブリンまたはそれらのコンプレックスは製剤的に可能な剤形で製造することができ、この形態は投与様式に依拠して変化する。

ヒト型化免疫グロブリンはまたヒト患者の血栓あるいは表面にGP IIb/IIIaを発現するある種の癌の存在および位置の診断に用いるために標識物質と一緒に使用することもできる。このような標識物質には放射線不透過性染料、放射線造影剤、蛍光分子、スピン標識分子、酵素または、特に放射線学または磁気共鳴イメージング技術において診断的価値のある他の標識物質が含まれるが、これらに限定されない。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、HおよびL鎖可変領域cDNAのアンカード(anchored)PCRクローニング図式を示す。RNAは熱フェノール抽出法を使用して約 $10^7$ 個のハイブリドーマ細胞から作成した。簡単に言えば、細胞を1mlのRNA抽出緩衝液(50 mMの酢酸ナトリウム、pH 5.2/1% SDS)に懸濁して攪拌し、0.5mlのフェノール pH 5.2を用いて65℃で15分間抽出し、次いで氷上で更に15分間抽出した。水層を回収しそしてエタノールで2度沈殿させた。cDNAは逆転写酵素(BRL、メリーランド州ベセスダ)およびプライマーとしてオリゴdT<sub>12-18</sub>(Pharmacia、ニュージャージー州ビスカットウェイ)を使用して10μgの総RNAから合成した。ポリ(dG)テールは末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(BRL)を使用

してcDNAの3'末端に結合させた(E. Y. Loh等、Science 243、217 (1989))。可変領域遺伝子(V)は、ポリ(dG)テールとハイブリッド形成するプライマーmc045 (TAATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC) および定常領域遺伝子(C)とハイブリッド形成するプライマーを用いてAmpliTag (Perkin Elmer-Cetus) を使用して増幅させた。L鎖では、使用したプライマーはmc046 (TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC) であった。H鎖では、使用したプライマーはmc047 (TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (CAT)GATGGGG (GC)TGT (TC)GTTTTGGC) であった。括弧内の配列は縮重に対応する塩基を示す。縮重に対応する塩基が導入されたのでプライマーは大部分のガンマ鎖とハイブリッド形成することができたであろう。次いで、増幅したフラグメントはEcoRIおよびHindIIIで消化し、そして配列決定のためpUC18ベクター中にクローン化させた。

第2図は、抗体C4G1のL鎖(第2図A)とH鎖(第2図B)の可変領域のcDNA配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す。CDR配列には下線が引いてある。成熟L鎖タンパク質はアミノ酸21 Aspで始まりそして成熟H鎖タンパク質はアミノ酸20 Glnで始まっており、それぞれのシグナル配列で先行されている。

第3図は、プラスミドpVgl-dhfr(第3図A)およびpVk(第3図B)の概略図を示す。プラスミドpVgl-dhfrは次の部分を有している: ampおよびdhfr遺伝子を含む約4200の塩基対BamHI-EcoRIフラグメント; EcoRIおよびXbaIリンカーがそれぞれ5'および3'末端に接続したヒトサイトメガロウイルス(CMV)IE1遺伝子プロモーターおよびエンハンサーを含む630の塩基対フラグメント(Bos hart等、Cell 41、521 (1985)、これは本明細書に参考として組み入れる); 並びに215塩基対の先行イントロンおよびポリ(A)シグナルを有するヒトガンマー1定常領域を含む2800塩基対のHindIII-PvuIIフラグメント(Ellison等、Nucleic Acids Res. 10、4071 (1982)、これは本明細書に参考として組み入れる)。プラスミドpVkは、ガンマー1遺伝子を置換したヒトカッパ定常領域遺伝子および約335塩基対の先行イントロンを含む1530塩基対のEcoRI-XbaIフラグメント(Hi eter等、Cell 22、197 (1980)、これは本明細書に参考として組み入れる)並びにdhfr遺伝子を置換したgpt遺伝子を用いて同様にして構築した。ヒトガンマー1およびカッパ定常領域遺伝子を含むフラグメントは創製されたXbaIおよびBamH

I部位がそれぞれ5'および3'末端に接続されている。これらプラスミドは当該技術分野で周知の方法を使用して指定された部分から構築した (Maniatis等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、ニューヨーク州コールドスプリングハーバーのCold Harbor Laboratory参照)。例えば、pVg1-dhfrは、hyg遺伝子を含むHind III-Bgl IIフラグメントをdhfr遺伝子を含むし、Bgl II部位まで含む660塩基対のフラグメントで置換し (Simonsen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80、2495 (1983))、そして免疫グロブリンプロモーターおよびエンハンサーを含むEcoRI-Xba I フラグメントをCMVプロモーターおよびエンハンサーを含むフラグメントで置換することによってプラスミドpV $\gamma$ 1から構築した (Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029 (1989))。

第4図は、抗体無し(---)、キメラC4G1抗体(...)、ヒト型化C4G1抗体(—)で染色したHEL 92.1.7細胞のフローサイトメトリー (fluorocytometry)を示す。細胞はFACS緩衝液(PBS+2% FCS+0.1% アジ化ナトリウム)中約 $5 \times 10^6$ /mlで懸濁した。100 $\mu$ lの細胞懸濁液をポリスチレン管に移し、そして氷上で80ngの精製抗体と共に30分間インキュベートした。細胞はFACS緩衝液で洗浄し、そしてFITC標識ヤギ抗ヒトIg抗体と共に氷上で更に30分間インキュベートした。細胞は再度洗浄し、そして最後にPBS+1%パラホルムアルデヒド中に再懸濁した。細胞はFACSmate (Becton Dickinson)で分析した。

第5図は、ヒト型化C4G1抗体(上部列)およびマウスC4G1抗体(下部列)のL鎖(第5図A)およびH鎖(第5図B)可変領域のシグナル配列を含まないアミノ酸配列を示す。各鎖の3つのCDRには下線が引いてある。ヒト型化抗体中でマウスアミノ酸またはコンセンサスヒトアミノ酸で置換されているフレームワークの残基には二重線が引いてある。ヒト型化C4G1抗体の完全なL鎖(第5図C)およびH鎖(第5図D)のアミノ酸配列を示す。

第6図は、ヒト型化C4G1のH鎖(rh29-rh32)およびL鎖(rh33-rh36)の構築に使用したオリゴヌクレオチドを示す。下記のオリゴヌクレオチド対を混合し、KlenowポリメラーゼまたはAmpliTaqaで伸長させ、そしてpUC18に連結する前に指定された酵素: rh29およびrh30はXba IおよびEco RIで、rh31およびrh32はXba Iお



よびEco RIで、rh33およびrh34はXba IおよびHind IIIで、rh35およびrh36はXba IおよびHind IIIで切断した。次いで、rh29-rh30およびrh31-rh32フラグメントはXba IおよびXho Iを用いてpUC18から切断しそしてpVgl-dhfrのXba I部位と一緒に連結し、そしてrh33-rh34およびrh35-rh36フラグメントはXba IおよびHind IIIで切断しそしてpVklのXba I部位と一緒に連結した。

第7図A及びBは、ヒト型化FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのH鎖の発現にそれぞれ使用されるプラスミドpHFab.D (第7図A) およびpHF(ab')<sub>2</sub>.D (第7図B) の概略図を示す。このプラスミドはプラスミドpVgl-dhfr (第3図) に類似しているが、pHFab.DはヒトC $\gamma$ 1遺伝子のC $\mu$ 1とヒンジエクソンの最初の5個のアミノ酸、続いて停止コドンおよびスプライス供与シグナルしか有しておらず；そしてpHF(ab')<sub>2</sub>.DはC $\mu$ 1、ヒンジおよびC $\mu$ 2の最初の2個のアミノ酸、続いて停止コドンおよびスプライス供与シグナルしか有していない。最終エクソンの後にはボリアシグナルを有するマウス $\gamma$ 2a定常領域遺伝子以外から得られる領域が続いている。また、第7図C及びDは、ヒト型化C4G1抗体のFabフラグメント (第7図C) およびF(ab')<sub>2</sub>-1と称される組換えF(ab')<sub>2</sub>フラグメント (第7図D) のH鎖のアミノ酸配列を夫々示す。

第8図は、ヒト型化およびマウスC4G1抗体およびフラグメントの血小板への競合的結合を示す。約 $3 \times 10^7$ 個の血小板は4.5ngの放射性ヨウ素標識マウスC4G1トレーサー抗体 ( $3.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) および種々の量の非標識マウスC4G1抗体若しくはフラグメント (黒印) かまたはヒト型化C4G1抗体若しくはフラグメント (白印) と共にインキュベートした。図中Aは、完全抗体、Bは、Fabフラグメント、Cは、マウスF(ab')<sub>2</sub>およびヒト型化F(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントを示す。

第9図においては、図AはマウスC4G1抗体によるおよび図Bはヒト型化C4G1抗体による血小板凝集阻止効果を示す。Y軸は光透過パーセントを示し、X軸は時間 (分) を示す。各パネルの上部の黒い曲線は抗体を添加しないときに血小板凝集で生じた光透過の上昇を示し、下部のより薄い曲線は、光透過の変化で測定されたとおり、抗体の添加によって血小板凝集が強く阻止されることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明に従って、GPIIb/IIIa 関連エпитープと特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンが提供される。これらの免疫グロブリンは GPIIb/IIIa に対して少なくとも約  $10^7 \text{M}^{-1}$ 、好ましくは  $10^8 \text{M}^{-1}$  乃至  $10^{10} \text{M}^{-1}$  またはそれ以上の強さの結合親和性を有し、例えば血小板凝集を阻止できる。ヒト型化免疫グロブリンはヒトのフレームワークを有し、そして免疫グロブリン、典型的には、GPIIb/IIIa 抗原と特異的に反応するマウス免疫グロブリンから得られる 1 つまたはそれ以上の相補性決定領域 (CDR) を有する。好ましい実施態様では、1 つまたはそれ以上の CDR は C4G1 抗体に由来する。かくして、経済的に大量生産し得る本発明の免疫グロブリンは、例えば、種々の技術によるヒト患者の血小板介在疾患の治療用途が見い出されている。

基本的な抗体構造単位は四量体からなっていることが知られている。各四量体は 2 つの同一対のポリペプチド鎖からなっており、各対は 1 つの「L」鎖 (約 25 kD) および 1 つの「H」鎖 (約 50-70 kD) を有している。各鎖のアミノ末端部分には主として抗原認識を行う約 100 から 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域がある。各鎖のカルボキシ末端部分は主としてエフェクター機能を果たす定常領域である。

L 鎖はカッパ ( $\kappa$ ) かまたはラムダ ( $\lambda$ ) かのいずれかに分類される。H 鎖はガンマ ( $\gamma$ )、ミュー ( $\mu$ )、アルファ ( $\alpha$ )、デルタ ( $\delta$ ) またはイプシロン ( $\epsilon$ ) として分類され、そして抗体のアイソタイプ (isotype) をそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD および IgE として明示する。L 鎖および H 鎖内で、可変および定常領域は約 12 またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域によって結合されており、H 鎖はまた約 10 またはそれ以上のアミノ酸の「D」領域も有している (一般的には、Fundamental Immunology、W. Paul 編、7 章、131-166 頁、ニューヨーク州の Raven Press (1984)、これは本明細書に参考として組み入れる)。

各 L/H 鎖対の可変領域は抗体の結合部位を形成する。これらの鎖は全て、基本的には同一の構造をもち相補性決定領域または CDR と呼ばれる 3 つの超可変領域と、CDR を結合する相対的に保存されたフレームワーク領域とからなる (「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、E. Kabat 等、米国保健福祉省 (1987); および Chothia および Lesk、J. Mol. Biol.、196、901-917

(1987)、これらは本明細書に参考として組み入れる)。各対の2つの鎖から得られるCDRはフレームワーク領域によって正しく位置が決定され、特定のエピトープに結合することができる。

本明細書で使用する時、用語「免疫グロブリン」は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされた1つまたはそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質を言う。認識される免疫グロブリン遺伝子にはカッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー一定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子がある。免疫グロブリンは、例えば、Fv、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>、並びに二機能性ハイブリッド抗体（例えば、Lanzavecchia等、Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))を含む抗体以外の種々の形態並びに1本鎖（例えば、Huston等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879~5883 (1988) およびBird等、Science, 242, 423~426 (1988)、これらは本明細書に参考として組み入れる）で存在することができる。（一般的には、Hood等、Immunology、ニューヨーク州ベンジャミン、第2版(1984)、Hallow and Lane、Antibodies. A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 並びにHunkapillerおよびHood、Nature, 323, 15~16 (1986)、これらは本明細書に参考として組み入れる）。

キメラ抗体は、抗体のLおよびH鎖遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子断片から、典型的には遺伝子工学によって構築されるものである。例えば、マウスモノクローナル抗体から得られる遺伝子の可変(V)断片は $\gamma 1$ および $\gamma 3$ のようなヒト定常(C)断片と結合させることができる。それ故、典型的な治療用キメラ抗体は、マウス（他の哺乳動物種を使用することもできる）抗体から得られるVまたは抗原結合ドメインおよびヒト抗体から得られるCまたはエフェクタードメインからなるハイブリッドタンパク質である。

本明細書で使用する時、用語「フレームワーク領域」はKabat等、前掲で定義されているように、1つの種の異なる免疫グロブリン中で相対的に保存されている（即ち、CDR以外の）免疫グロブリンLおよびH鎖可変領域の部分を言う。本明細書で使用する時、「ヒトフレームワーク領域」は自然産生のヒト抗体フレームワークと実質的に同一（約85%またはそれ以上同一）であるフレームワーク領域である。

本明細書で使用する時、用語「ヒト型化免疫グロブリン」はヒトフレームワーク、非ヒト抗体から得られる少なくとも1つのCDRを含んでなり、その際存在する任意の定常領域はヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、即ち、少なくとも約85～90%、好ましくは少なくとも95%が同一である免疫グロブリンを言う。それ故、ヒト型化免疫グロブリンの部分は全て、多分CDRを除いて、1つまたはそれ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。例えば、ヒト型化免疫グロブリンはキメラマウス可変領域／ヒト定常領域抗体は包含しないであろう。

ヒト型化抗体はヒトの治療に使用するときマウス、そして場合によってはキメラ抗体に比べて少なくとも下記の3つの利点を有している：

- 1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト型化抗体はヒト免疫系の他の部分とより良好に相互に作用することができる（例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）によって標的細胞をより効果的に破壊する）。
- 2) ヒト免疫系はヒト型化抗体のフレームワークまたはC領域を外来物として認識せず、そしてその結果このような注入抗体に対する抗体応答は全体として外来のマウス抗体または部分的に外来のキメラ抗体に対するより少ない。
- 3) 注入されたマウス抗体はヒト血液循環での半減期が通常の抗体の半減期より短いと報告されている（D. Shaw等、J. Immunol. 138、4534～4538（1987））。注入されたヒト型化抗体は多分、自然産生のヒト抗体と本質的に同一の半減期を有しており、投与すべき投与量および回数をより少なくすることができるであろう。

ある面では、本発明は、GP11b/IIIa抗原の所望のエピトープに結合し得る免疫グロブリン（例えば、モノクローナル抗体C4G1、7E3、10E5またはAP-2）から得られるHおよび／またはL鎖CDRをコードする組換えポリヌクレオチド、に向けられている。これらの領域をコードするポリヌクレオチドは典型的には、適当なヒトフレームワーク領域をコードするポリヌクレオチドに結合する。ヒトフレームワークは、CDRを得る非ヒト免疫グロブリンのフレームワークまたは

可変領域のアミノ酸配列を、ヒト免疫グロブリンのシーケンスコレクション中の対応する配列と比較して、相同性の高い配列を選び用いる。モノクローナル抗体C4G1のHおよびL鎖CDRを含んでなるポリペプチド鎖をコードする代表的なポリヌクレオチドは第2図に含まれる。コドン縮重および重要でないアミノ酸の置換によって、それらの配列を他のポリヌクレオチド配列で以下で詳記するように容易に置換することができる。ヒト型化免疫グロブリンの設計は、以下のように行うことができる。

(1) (a) ~ (c) に該当するアミノ酸は、CDRを得る非ヒト免疫グロブリン(供与体免疫グロブリン)からのフレームワークアミノ酸により、フレームワークを用いるヒト免疫グロブリン(受容体免疫グロブリン)のフレームワークアミノ酸を置換する。

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がヒト免疫グロブリンのその位置に稀であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に典型的である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3 Å以内にある。(Queen等、前掲およびCo等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869 (1991) 参照。これらは共に本明細書に参考として組み入れる)。

(2) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸及び給与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に稀である場合、ヒトフレームワークのその位置に典型的であるアミノ酸に置換する。ヒト型化免疫グロブリンの製造の詳細な説明については、Queen等、前掲およびCo等前掲参照。

上記ポリヌクレオチドは典型的には、ヒト型化免疫グロブリンをコードする配列に操作的に連結された、天然関連領域または異種プロモーター領域を含む発現調節ポリヌクレオチド配列を更に有している。好ましくは、発現調節配列は真核宿主細胞を形質転換し得るベクター中の真核プロモーター系であるが、原核宿主の調節配列を使用することもできる。ベクターが適当な宿主に導入されるとすぐ、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現に適する条件下で維持し、そして所望の

場合続いてL鎖、H鎖、L/H鎖二量体または完全抗体、結合フラグメントまたは他の免疫グロブリンを採集しそして精製することができる。

所望のヒト型化抗体を永続的に発現し得る本発明の塩基配列は種々のポリヌクレオチド（ゲノムまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等）および成分（例えば、V、J、DおよびC領域）から多種多様の技術によって形成させることができる。適当なゲノムと合成ヌクレオチド配列を結合させることが現在最も通常の製造方法であるが、cDNA配列を使用することもできる（ヨーロッパ公開特許第0239400号およびL. Reichmann等、Nature 332、323～327（1988）参照、これらは共に本明細書に参考として組み入れる）。

ヒト定常領域DNA配列は種々のヒト細胞から周知の方法に従って単離することができるが、不死化B細胞からが好ましい（Kabat、前掲およびWP87/02671参照）。本発明の免疫グロブリンの製造に使用するCDRは同様に、GP11b/IIIaに結合し得るモノクローナル抗体から誘導され、そして周知の方法によって抗体を産生し得るマウス、ラット、ウサギまたは他の脊椎動物を含めて任意の好都合な哺乳類種中で製造される。上記ポリヌクレオチド供給源としての細胞並びに免疫グロブリン発現および分泌に使用する宿主細胞はATCCのような多数の供給源から得ることができる（Catalogue of Cell Lines and Hybridomas、第5版（1985）、米国メリーランド州ロックビル、これは本明細書に参考として組み入れる）。

本明細書に特に記載したヒト型化免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に同種の」修飾免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当該技術分野の熟練者に周知の種々の組換えDNA技術を使用して製造することができる。例えば、フレームワーク領域において、幾つかのアミノ酸置換、末端および中間部分でのアミノ酸付加並びに欠失等によって天然配列の一次構造を変えることができる。更に、多種多様のヒトフレームワーク領域を単独でまたは組み合わせて本発明のヒト型化免疫グロブリンのベースとして使用することができる。一般的に、遺伝子の修飾は特定部位の突然変異誘発のような種々の周知の技術で容易に達成することができる（GillmanおよびSmith、Gene 8、81～97（1979）並びにS. Roberts等、Nature 328、731～734（1987）参照、これらは共に本明細書に参考として組み入れる）。

或いは、1つまたはそれ以上の免疫グロブリン活性（例えば、補体結合活性）を有する主要な抗体構造の一部分だけからなるポリペプチドフラグメントを製造することができる。これらのポリペプチドフラグメントは当該技術分野で周知の方法による完全抗体のタンパク質分解酵素による切断によってか、或いは特定部位の突然変異誘発を使用してベクター pVk および pVgl-dhfr（第3図）の所望の位置に、例えば Fab フラグメントを製造するために CH1 の後にまたは F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを製造するために ヒンジ領域の後に停止コドン挿入することによって製造することができる。1本鎖抗体は VL と VH を DNA リンカーで結合させることによって製造することができる（Huston等、前掲、および Bird等、前掲参照）。また、多数の遺伝子と同様に、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1つまたはそれ以上の明確な生物学的活性を有する別々の機能性領域も有しているので、これら遺伝子は他の遺伝子から得られる機能性領域に融合させて新しい特性を有する融合タンパク質を製造することができる。

上記したように、ポリヌクレオチドは、その配列を発現調節配列と操作的に結合させた（即ち、発現調節配列を確実に機能化させるように位置させた）後宿主内で発現させられる。これらの発現ベクターは典型的には、エピソーム（episome）としてかまたは宿主染色体 DNA に組み込まれて宿主生物内で複製可能である。一般的に、発現ベクターには所望の DNA 配列で形質転換された細胞の検出が可能になるように選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシンが含まれる（例えば、米国特許4,704,362参照、これは本明細書に参考として組み入れる）。

大腸菌（*E. Coli*）は本発明のポリヌクレオチドをクローン化するのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適する他の微生物宿主には桿菌、例えば枯草菌（*Bacillus subtilis*）、および他の腸内細菌、例えばサルモネラ（*Salmonella*）、セラチア（*Serratia*）および種々のシュードモナス（*Pseudomonas*）種が含まれる。これらの原核生物宿主中で、宿主細胞と適合できる発現調節配列を典型的に含有する発現ベクターも製造することができる（例えば、複製オリジン（origin））。更に、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ベータラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダから得られるプロモ

ーター系のような多数の多様な周知のプロモーターが存在する。プロモーターは、任意にオペレーター配列を有し、典型的には発現を調節し、そして転写および翻訳を開始させそして完結させるリボソーム結合部位配列等を有している。

酵母のような他の微生物も発現用に使用することができる。サッカロミセス (*Saccharomyces*) は好ましい宿主であり、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素を含むプロモーターのような発現調節配列、および所望の複製オリジン、終結配列等を有する適当なベクターを有している。

微生物に加えて、哺乳動物由来培養細胞も本発明のポリペプチドを発現させそして製造するために使用することができる (Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers、ニューヨーク州ニューヨーク (1987) 参照、これは本明細書に参考として組み入れる)。真核細胞は、完全免疫グロブリンを分泌し得る多数の適当な宿主細胞株が当該技術分野で開発されている。これらにはCHO細胞株、種々のCOS細胞株、HeLa細胞、好ましくはミエローマ細胞株等または形質転換されたB細胞若しくはハイブリドーマが含まれる。これら細胞の発現ベクターは発現調節配列、例えば複製オリジン、プロモーター、エンハンサー (Queen等、Immunol. Rev. 89、49~68 (1986)、これは本明細書に参考として組み入れる)、並びに必要なプロセッシング伝達部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、サイトメガロウイルス等から誘導されるプロモーターである。

重要なポリヌクレオチド配列 (例えば、HおよびL鎖をコードする配列および発現調節配列) を含有するベクターは周知の方法で宿主細胞中に導入することができ、該方法は細胞宿主のタイプに依存して変化する。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは通常原核細胞に使用され、一方リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーション (electroporation) は他の細胞宿主用に使用することができる。(一般的には、Maniatis等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press (1982)、これは本明細書に参考として組み入れる。)

発現された、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々のLおよびH鎖または



他の免疫グロブリンは、硫酸アンモニウム沈降法、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当該技術の標準的な方法に従って精製することができる（一般的には、R. Scopes、Protein Purification、Springer-Verlag、ニューヨーク（1982）、これは本明細書に参考として組み入れる）。医薬品として使用するためには、少なくとも約90乃至95%純度の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、そして98乃至99%またはそれ以上の純度のものが最も好ましい。ひとたび部分的にまたは所望の純度にまで精製されると、このポリペプチドは治療的に（体外的適用を含む）またはアッセイ法、蛍光免疫染色法等の開発および実施に使用することができる。（一般的には、Immunological Methods、IおよびII巻、LefkovitsおよびPernis編、Academic Press、ニューヨーク州ニューヨーク（1979および1981）参照）。

本発明の免疫グロブリンは典型的には、心血管疾病及び他の血栓塞栓性疾患の治療に単独での使用が可能である。例えば、治療に適する典型的な疾病状態には急性心筋梗塞、不安定狭心症、卒中、一過性虚血発作、深部静脈血栓症および肺塞栓症が含まれる（一般的には、Hoffbrand & Pettit、Essential Haematology、Blackwell Scientific Publications、オックスフォード（1980）参照）。これら免疫グロブリンはまた血管形成術後の再開塞及び血管手術後、透析や心肺体外循環等の血液体外循環後または最中の閉塞を防ぐために使用することもできる。

本発明の免疫グロブリンは、他の血小板が関与する疾患の治療にも使用できるであろう。例えば、腎炎、末梢循環障害、閉塞性血栓血管炎、移植後の血栓、慢性動脈閉塞症、閉塞性動脈硬化症、冠硬化症、うっ血性心不全及び脳血管れん縮等の治療である。また、血栓性血小板減少性紫斑病、HUS及び血小板の関与する自己免疫疾患の治療、癌転移の抑制、巨核球又は巨核芽球の分化又は誘導を促す為にも用いることができるかもしれない。

本発明のヒト型化免疫グロブリンは、GP IIb/IIIaに結合する抗体のうち血小板凝集を阻害する免疫グロブリン由来のCDRを用いることが好ましい。また、血管内皮と反応する抗体は、血管内皮に障害を与える可能性があり、7E3等は血管内皮と反応することが知られている（ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 614、204（1991））。従って、さらに好ましくは、血小板上にはエピトープがあるが、

血管内皮上にはエпитープが存在しないか、少ないC4G1等の免疫グロブリン由来のCDRを用いる。マウス抗体C4G1によって同定される抗原決定基に結合するヒト型化免疫グロブリンのような本発明のヒト型化免疫グロブリンは、投与した場合、内皮細胞を損傷させないことが期待される。

ADP、アドレナリン刺激による血小板凝集では、これらのアゴニスト添加後最初に見られる可逆的な一次凝集と、次いで用量依存的に非可逆的で放出反応を伴う二次凝集が見られる。7E3等の抗体では、血小板を予め抗体で処理しておいた場合に凝集阻害をすることは知られているが、血小板凝集の過程で抗体を加えた場合に凝集阻害をすることが知られているものはなかった。しかし、C4G1は、一次凝集を阻害するのみならず、一次凝集が惹起された後に添加した場合に、二次凝集を阻害する作用を持つことが確認された。従って、C4G1又は前述のC4G1と同様の作用をもつ免疫グロブリン由来のCDRを用いたヒト型化免疫グロブリンは、血栓性疾患急性期に於ける血小板活性化及び凝集の初期過程をも抑制することが期待できる。

血栓性疾患の治療に際し、PTCA、PTCR等によって血行再建がえられた後の急激なトロンボキサンA<sub>2</sub>、PAI-1等の血中レベルの上昇が知られている。その原因として血小板の活性化及び種々のメディエーター（TGF- $\beta$ 1、PDGF等）の放出が重要視されている。マウスC4G1は、*in vitro*でADP刺激による血小板凝集を抑制するとともに、血小板放出反応も抑制した。従って、マウスC4G1等の血小板凝集と血小板放出反応を抑制する免疫グロブリン由来のCDRを用いたヒト型化免疫グロブリンは、人に投与した際に、血小板凝集を抑制するのみでなく、血小板放出反応を抑制してPTCA、PTCR等の血行再建療法後の副作用を抑制する可能性がある。

本発明の任意のヒト型化免疫グロブリンはまた他の抗体、特に、種々の血小板抗原または血液凝固因子と反応するヒト型化抗体と組み合わせて使用することもできる。例えば、ヒト型化免疫グロブリンの混合物が反応し得る適当な抗原にはVLA-2、VLA-5、GPIb、GPIV、フォンビルブランド因子、トロンビンおよび血小板トロンビンレセプターが含まれる（Coller、New Eng. J. Med. 322、33（1990）参照）。

これら免疫グロブリンはまた他の治療剤と一緒に使用される、別々に投与され

る組成物として使用することもできる。典型的には、これら薬剤にはアスピリンおよびヘパリンがあるが、心血管疾病を治療するために当該技術分野の熟練者に周知の多数の他の薬剤（例えば、tPA）を使用することもできる。

本発明のヒト型化免疫グロブリンおよび該免疫グロブリンの製剤組成物は非経口投与、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に特に有用である。非経口投与は通常、投与可能な担体、好ましくは水性担体に溶解した免疫グロブリンまたはその混合物の溶液からなる。種々の水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン、5%のグルコース、ヒトアルブミン溶液等を使用することができる。これらの溶液は無菌でありそして一般的に粒子物質を有していない。これらの組成物は慣用で周知の滅菌技術によって滅菌することができる。これら組成物はpH調整および緩衝化剤、等張化剤、毒性調整剤等のような生理学的条件に近づけるのに必要な製剤的に投与されうる補助物、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等を含むことができる。これら処方中の免疫グロブリンの濃度は広範に、即ち、約0.5重量%未満、通常は少なくとも約1重量%から15または20重量%ほどの多い量まで変化させることができ、そして選択される特別の投与様式に従って、主として容積、粘度等に基づいて選択される。

かくして、注射用の典型的な製剤組成物は1mlの滅菌緩衝水および1~10mgの免疫グロブリンを含むように構成することができよう。静脈内注入用の典型的な組成物は250mlの滅菌リンゲル溶液および150mgの抗体を含むように構成することができよう。非経口的に投与できる組成物の実際の製造方法は当該技術分野の熟練者に既知であるかまたは明らかであり、そして、例えば、Remington's Pharmaceutical Science、第15版、Mack Publishing Company、ペンシルベニア州イーストン（1980）（これは本明細書に参考として組み入れる）に更に詳細に記載されている。

本発明の免疫グロブリンは貯蔵するため冷凍するかまたは凍結乾燥しそして使用する前に適当な溶媒で再生させることができる。この技術は慣用の免疫グロブリンに関して有効であることが示されており、そして当該技術分野で既知の凍結乾燥および再生技術を使用することができる。凍結乾燥および再生が種々の程度

の抗体活性損失をもたらすことがあり（例えば、通常の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体より多くの活性が損なわれる傾向がある）そして使用量は調整して補正しなければならないと当該技術分野の熟練者は考えるであろう。

本願のヒト型化免疫グロブリンまたはその混合物を含有する組成物は治療的または予防的処置に使用することができる。治療的な適用では、組成物は動脈血栓症または他の血小板介在疾患に既に罹っている患者に、疾病およびその合併症を治療するかまたは少なくとも部分的にそれらを抑止するのに十分な量で投与される。これを達成するために適当な量は「治療的有效投与量」と定義される。この用途に有効な量は疾病の重篤さおよび患者自身の免疫系の一般的な状態に依存するが、一般的には投与量当たり約1から約200mgまでの抗体の範囲であり、より一般的には患者当たり5から25mgまでの投与量が使用される。本発明の物質は一般的に重篤な疾病状態、即ち生命を脅かすかまたは生命を脅かす可能性のある状況下で使用することができることに留意すべきである。このような場合には、本発明のヒト型化免疫グロブリンによって生体外物質の最少化および「外来物質」拒絶の可能性の低下が達成されることからみて、実質的に多量の上記免疫グロブリンを投与することが可能であり、そして治療する医師によって望ましいと考えられよう。典型的な予防的使用には、バルーン血管形成術を受けている患者の急性閉塞を防ぐためや1度心臓発作または卒中を起こした患者のその後の発作を防ぐための治療がある。

これら組成物の1回または複数回投与は治療する医師によって選択される投与値およびパターンで実施することができる。いずれにしても、本薬剤処方患者を有効に治療するのに十分な量の本発明の免疫グロブリン（単数または複数）を提供する。

特別の実施態様では、本発明のヒト型化免疫グロブリンからなる組成物はヒト患者の血栓の存在および位置を診断するために使用することができる。例としてであって限定するためではないが、マウス抗体C4G1が結合する抗原決定基は血小板上に存在するが血管内皮細胞には存在しないかまたは量が少ない。かくして、マウス抗体C4G1によって同定される抗原決定基に結合するヒト型化免疫グロブリンのような本発明のヒト型化免疫グロブリンは、有意な濃度の活性化血小板を含

有する解剖学的部位、例えば血栓部位を同定するために標識しそして使用することができる。例としてであって限定するためではないが、1つまたはそれ以上の標識物質をヒト型化免疫グロブリンに結合させることができる。代表的な標識物質には放射線不透過性染料、放射線造影剤、蛍光分子、スピン標識分子、酵素または、特に放射線学または磁気共鳴像形成技術で診断的価値のある他の標識物質が含まれるがこれらに限定されない。

本発明のヒト型化免疫グロブリンには更にインビトロでの広範な有用性を見出すことができる。例として、本発明の免疫グロブリンはGPIIb/IIIa抗原の検出、血小板の単離等に使用することができる。

診断の目的では、本発明の免疫グロブリンは標識するかまたは標識しないで用いることができる。標識しない免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体でヒト型化抗体と反応する他の標識抗体（二次抗体）と組み合わせて使用することができる。或いは、本発明の免疫グロブリンは直接標識することができる。放射性核種、蛍光体、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素インヒビター、リガンド（特にハプテン）等のような広範囲の標識を使用することができる。多数のタイプのイムノアッセイが利用可能でありそしてそれらは当該技術分野の熟練者に周知である。

細胞活性に対する保護若しくはその検出または選択した抗原の存在の検出に対象抗体を用いて使用するためにキットとして供給することもできる。かくして、本発明対象の免疫グロブリン組成物は単独かまたは所望の細胞タイプに特異的な他の抗体と一緒にして、通常容器中の凍結乾燥形態で提供することができる。標識若しくは毒素と抱合するかまたは抱合しないことができる本発明の免疫グロブリンは、トリス、リン酸塩、炭酸塩等のような緩衝液、安定化剤、保存剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等および1組の使用説明書と共にキットに含めることができる。一般的に、これらの材料は活性免疫グロブリンの量に基づいて約5%未満で存在し、そして通常は再び免疫グロブリン濃度に基づいて少なくとも約0.001重量%の総量で存在している。しばしば、活性成分を希釈するために化学作用を起こさない増量剤または賦形剤を含めることが望ましく、その際賦形剤は総組成物の約1から99重量%までで存在することができる。免疫グロブリン

ンと結合可能な二次抗体をアッセイに使用する場合、これは通常別々のバイアル中に存在する。二次抗体は典型的には標識と抱合しており、そして上記した免疫グロブリン処方物と類似する方法で処方される。

以下の実施例は説明のために提供するものであって限定するものではない。これら実施例はC4G1抗体に関連しているが、GPIIb/IIIa抗体に対し高い結合親和性を有するヒト型化抗体の製造はまた10E5、7E3、AP-2またはGPIIb/IIIaのエピトープに結合する他のモノクローナル抗体から得られるCDRの使用も意図されていることが理解されよう。

#### 実施例

##### H鎖およびL鎖cDNAのクローニング

H鎖およびL鎖の可変領域遺伝子のcDNAは、定常領域とハイブリッド形成しそしてHindIII部位を含有する3'プライマーおよびdGテールとハイブリッド形成しそしてEcoRI部位を含有する5'プライマーを使用して、アンカードPCR (E. Y. Loh等、Science 243、217 (1989)) を使用してクローン化した (第1図に示される図式)。PCR増幅フラグメントはEcoRIおよびHindIIIで消化し、そして塩基配列決定のためにpUC18ベクター中にクローン化した。C4G1では、2つのガンマー1特異性および2つのカッパ特異的クローンの配列決定をした。2つのガンマー1クローンおよび2つのカッパクローンはそれぞれ配列が同一である。cDNA可変領域配列および推定アミノ酸配列は第2図に示す。

##### キメラ抗体の構築および発現

プラスミドベクターはキメラ抗体遺伝子を構築および発現させるために調製した。プラスミドpVg1-dhfr (第3図A) はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーターおよびエンハンサー (M. Boshart等、Cell 41、521 (1985))、先行イントロン部を有するヒトゲノムC $\gamma$ 1断片、並びに選択用のジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) 遺伝子 (Simonsen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80、2495 (1984)、これは本明細書に参考として組み入れる) を含有している。プラスミドpVk (第3図B) はpVg1-dhfrに類似しているが、ヒトゲノムC $\kappa$ 断片およびgpt遺伝子を含有している。C4G1HおよびL鎖可変領域の誘導体はPCRによってcDNAから

調製した。5'プライマーはATGコドンで開始してV領域とハイブリッド形成しそしてXbaI部位を含有していた；3'プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリッド形成しそしてスプライス供与シグナルおよびXbaI部位を含有していた（Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029（1989）、これは本明細書に参考として組み入れる）。修飾したV領域は定常領域のCMVプロモーターと部分的イントロンとの間のそれぞれのプラスミドベクターのXbaI部位中にクローン化した。

キメラ抗体を発現させるために、H鎖およびカッパ鎖プラスミドはエレクトロポレーションによりSp2/0マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、gpt発現で選択した。最大量の完全抗体を分泌するクローンはELISA法で検出した。精製したキメラC4G1抗体はGP11b/IIIa抗原を発現するHEL 92.1.7細胞と結合し、これはフローサイトメトリーによって、示された（第4図）。

#### ヒト型化抗体のコンピューターモデル構築

ヒト型化抗体中で高結合親和性を保持するために、Queen等の一般的な方法に従った（Queen等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029（1989）およびWO 90/07861参照、これらは本明細書に参考として組み入れる）。ヒト抗体が元々のマウス抗体と相同であればあるほど、マウスCDR抗体をヒトフレームワークと組み合わせることによって、親和性を減少させる歪みをCDR抗体中に導入する可能性がますます少なくなる。通常は、H鎖とL鎖の組合せの不適合性の可能性を減少させるように、フレームワーク配列を提供するためには同一のヒト抗体から得られるH鎖およびL鎖が選択される。NBRFタンパク質配列データベースによる配列ホモロジー検索に基づいて（MicroGenie Sequence Analysis Software（Beckman）で実施した）、C4G1のヒト型化用のフレームワーク配列を提供するためにEu抗体を選択した。

C4G1可変領域のモデルを構築するためにコンピュータープログラムENCAD（M. Levitt、J. Mol. Biol. 168、595（1983）、これは本明細書に参考として組み入れる）を使用した。このモデルを使用して、CDR（下記4のカテゴリー）と相互作用できるほどCDRに十分近接したC4G1フレームワーク中のアミノ酸を決定し

た。ヒト型化L鎖およびH鎖C4G1可変領域を設計するために、アミノ酸は各位置でその位置が下記の5つのカテゴリーの1つまたはそれ以上の範囲内にない限り、EU抗体と同一であるように選択した：

- (1) 位置がCDR内にある、
- (2) Euアミノ酸がその位置でヒト抗体に稀であり、一方C4G1アミノ酸がその位置でヒト抗体に典型的である、
- (3) 位置がCDRにびったり隣接している、
- (4) 上記モデルが、アミノ酸は抗原結合領域(CDR)と物理的に近接することができることを示唆する。

カテゴリー(2)では、「稀である」はEuL鎖およびH鎖と同一のサブグループ(Kabat等、前掲で定義されている)においてヒト配列の約20%未満で生じるアミノ酸を含むように解釈され、そして「典型的」は上記サブグループにおいてヒト配列の約25%以上ではあるが一般的には50%以上で生じるアミノ酸を含むように解釈される。これらのカテゴリーの位置では、マウスC4G1抗体から得られるアミノ酸を使用した。更に、位置が5番目のカテゴリー、即ち、

- (5) Euアミノ酸がその位置ではヒト抗体において非常に稀であり、そしてC4G1アミノ酸は異なっているが稀である場合、

この場合は、その位置のヒト抗体に典型的なアミノ酸を使用することができる。

各カテゴリー内のアミノ酸は表1に示す。幾つかのアミノ酸は1つ以上のカテゴリー内にあることができる。ヒト型化C4G1L鎖およびH鎖可変領域の最終配列は、マウスC4G1配列と比較して、第5図A、Bに示す。

表1

カテゴリー	L鎖	H鎖
1	24-34、50-56、89-97	31-35、50-66、99-108
2	48、63	93、98、109、110、113
3	—	30、98、109
4	7、22、48、70、71、87	27、28、30、48、70、72 98、109



### ヒト型化抗体の合成

ヒト型化抗体の遺伝子を構築するために、ヒト型化HおよびL鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選択した。これには典型的な免疫グロブリンシグナルペプチドが含まれ、一般的にはマウス配列中に見られるコドンを使用した。幾つかの縮退コドンを変化させて制限酵素認識部位を創製するかまたは望ましくない制限酵素認識部位を除去した。このヌクレオチド配列はまた、キメラ遺伝子で使用する同一のスプライス供与シグナルおよび各末端のXbaI部位も有していた。各遺伝子は4つの部分的に重複する合成オリゴヌクレオチドから構築した。各可変領域遺伝子用に、ストランド間で交互に重複した2重の重複オリゴヌクレオチドを合成した。これはアミノ酸翻訳領域の配列並びにシグナルペプチドおよびスプライス供与シグナルを有していた（第6図）。オリゴヌクレオチドはアプライド バイオシステムズ（Applied Biosystems）380B DNA合成機で合成した。各オリゴヌクレオチドは約110～140塩基の長さであり、約15塩基を重複させた。2本鎖DNAフラグメントは各オリゴヌクレオチド対からKlenowポリメラーゼで合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターに連結しそして配列決定した。次いで、それぞれ正しい半分の配列を有する2つのフラグメントをpVg1-dhfrまたはpVk発現ベクターのXba I部位に正しい方向で連結して完全なH鎖およびL鎖遺伝子を製造した。例えば、ヒト型化C4G1可変領域遺伝子はpVg1-dhfrのXba Iフラグメントに含まれる。反応は当該技術分野で周知の条件下で実施した（Maniatis等、前掲）。ヒト型化C4G1抗体の完全H鎖およびL鎖の予想されるアミノ酸配列は第5図Cおよび第5図Dに示す。

H鎖およびL鎖プラスミドはエレクトロポレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞中にトランスフェクトさせ、そして細胞はgpt発現で選択した。クローンは培養上清液中のヒト抗体産生をELISA法でスクリーニングし、そして抗体は産生量の最も多いクローンから精製した。抗体はスタフィロコッカスプロテインA-セファロースCL-4B（Pharmacia）のカラムに組織培養上清液を通過させて精製した。結合抗体は0.2M グリシン-HCl、pH3.0で溶出し、そして1M トリス、pH8.0で

中和した。緩衝液はPD10カラム (Pharmacia) を通過させることによってPBSに交換した。

#### ヒト型化FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの製造

2つの別のベクターをヒト型化FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを製造するために構築した (第7図Aおよび第7図B)。ベクターを使用して直接製造した組換えF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを酵素消化で製造したF(ab')<sub>2</sub>フラグメントと区別するために、組換えフラグメントはF(ab')<sub>2</sub>-1と称する。Xba I部位から反時計回りでBam HI部位まで、これらのプラスミドはpVgl-dhfrと同一である (第3図A)。しかし乍ら、完全なヒトC $\gamma$ 1遺伝子の代わりに、プラスミドpHFab.DはC $\mu$ 1エクソンおよびヒンジエクソンの最初の5個のアミノ酸、続いて停止コドンおよびスプライス供与シグナルしか有しておらず、そしてプラスミドpHF(ab')<sub>2</sub>.DはC $\mu$ 1、ヒンジおよびC $\mu$ 2の最初の2個のアミノ酸 (ヒンジの1部としてスプライスに架橋するコドンを計数して)、続いて停止コドンおよびスプライス供与シグナルしか有していない。両プラスミド共に、最終エクソンの後に162塩基対のSal I-Bam HIフラグメントが続いており、これはマウス $\gamma$ 2a定常領域遺伝子のCH3エクソンのすぐ後の領域から得られそしてポリアデニル化シグナルを含有している。次いで、上記のヒト型化C4G1H鎖可変領域遺伝子を含有するXba IフラグメントはプラスミドpHFab.DおよびpHF(ab')<sub>2</sub>.Dの各々のXba I部位中に正しい方向で挿入した。プラスミドは全て、遺伝子工学分野の熟練者に周知のオリゴヌクレオチド合成およびPCRを含む標準的な方法で構築した。ヒト型化C4G1 FabおよびF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメント中のH鎖の予想アミノ酸配列は第7図Cおよび第7図Dに示す; これらフラグメント中のL鎖は完全抗体中のL鎖と同一である (第5図C)。

各H鎖遺伝子を含有するプラスミドはヒト型化C4G1L鎖遺伝子を含有するプラスミドとそれぞれ一緒にエレクトロポレーションによってSp2/0細胞にトランスフェクトさせ、そして細胞はgpt発現で選択した。クローンは培養上清液中のヒト抗体フラグメントをELISA法でスクリーニングし、そしてヒト型化C4G1抗体FabまたはF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントは最大産生量を与えるクローンから精製した。各フラグメントについて、濃縮培養上清液は最初20mMのトリス緩衝液、pH 8.6中でDEAE

ーセファロースカラムを通過させ、非吸着画分を更に精製に供した。FabフラグメントはCM-セファロースおよびフェニルセファロースで更に精製したが、一方F(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントはCM-セファロースおよびフェニルセファロース並びにS-200で更に精製して当該技術分野で周知の方法を使用してFab'他のオリゴマーからF(ab')<sub>2</sub>-1を分離した。当該技術分野で既知の他のタンパク質製造および精製方法も使用することができる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>-1のDEAE-セファロース非吸着フラクションはF(ab')<sub>2</sub>-1の収量を増加させるために10mMの還元グルタチオン中pH 9.0でインキュベートすることができる。

ヒト型化C4G1抗体およびフラグメントはまた他の僅かにまたはかなり異なる方法で精製することもできる。各場合において、細胞は10,000 gで10分間遠心して培養液から分離し、上清液は0.45 μmフィルターでろ過し、そしてその後、全抗体については30,000そしてフラグメントについては10,000の分子量カットオフ (MWCO) 膜を使用して約20倍に濃縮した。例えば、全ヒト型化C4G1抗体を製造するために、濃縮培養上清液を1 MのトリスでpH 7.5に調整し、10,000 gで10分間遠心し、そして0.45 μmフィルターでろ過した。次いで試料は、平衡および洗浄緩衝液として0.15M NaCl、0.05M トリス、pH 7.5、2mM EDTAを使用してプロテインA-セファロースFFカラム (Pharmacia) にアブライした。抗体はトリス塩酸でpH 3.5に調整した0.1Mの酢酸で溶出し、そして集めたフラクションはトリスでpH 7.5に調整した。次いで、集めたものを無菌透析チューブを使用してPBSで透析し、そして0.2 μmフィルターを使用してフィルター滅菌した。

サルでのエキスピボ実験用のヒト型化C4G1 Fabフラグメントを精製するために、濃縮培養上清液は20mM トリス、pH 8.6でフィルターろ過し、10,000 gで10分間遠心し、そして0.45 μmフィルターでろ過した。試料は10mM トリス、pH 8.6で平衡化したDEAEセファロース (Pharmacia) カラムにアブライし、そして非吸着画分を集めた。DEAEプールのバッファをMESで10mMにし、そしてHClでpH 6.5に調整した。次いで、試料を10mM MES、pH 6.5で平衡化したCMセファロース (Pharmacia) カラムにアブライし、0~500mM NaCl勾配で溶出した。Fabフラグメントは最初のピークに含まれていた。このピークフラクションのプールは10,000MWCO膜を使用して濃縮し、そしてPBSで平衡化したセファクリル S-200 (Pharmacia) カラムに

アブライした。ピークフラクションを集め、そして0.2 $\mu$ mのフィルターを使用してフィルター滅菌した。

ヒト型化C4G1 F(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントは次のように製造しそして精製することができる。濃縮培養上清液は20mM トリス、pH 8.6でフィルターろ過し、10,000 gで10分間遠心し、そして0.45 $\mu$ mフィルターでろ過する。試料は10mM トリス、pH 8.6で平衡化したDEAEセファロース (Pharmacia) カラムにアブライし、そして非吸着画分を集める。DEAEプールは10,000 MWCO膜を使用して約10倍に濃縮し、酢酸でpH 5.0に調整し、そして沈殿物を遠心で除去する。次いで、試料はトリスでpH 9.0に調整し、10mM 還元グルタチオンを加えそして22℃で30分間インキュベートする。次いで、試料は0.1M トリス、pH 9.0に対し4℃で16時間透析し、その結果約30%のF(ab')<sub>2</sub>-1が形成される。次いで、試料は10,000 MWCO膜を使用して約10倍に濃縮し、そしてセファクリル S-200カラムに入れる。90kDaのピークを集め、そして0.2 $\mu$ mフィルターを使用してフィルター滅菌する。

より高産生のヒト型化C4G1抗体およびフラグメント産生する細胞株は産生細胞株を高い濃度のメトトレキセート中でインキュベートすることによって得られる (Simonsen等、前掲)。或いは、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、上記の組換え方法の代わりに当該技術分野で周知の方法を使用して、完全ヒト型化C4G1抗体の酵素消化によって製造することができる (Antibodies. A Laboratory Manual、H alowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory、1988、これは本明細書に参考として組み入れる)。

例えば、ヒト型化C4G1 F(ab')<sub>2</sub>のもう1つの形態、即ちF(ab')<sub>2</sub>-2と称する形態は以下のようなペプシン消化によって製造した。ヒト型化C4G1 IgG産生細胞の培養上清液は1M トリスでpH 8.5に調整し、そして50mM トリス pH 8.5、150mM NaCl、2mM EDTAで平衡化したプロテインA親和性膜デバイス (Nygene) に適用した。全抗体は0.1M グリシン-HCl pH 2.5で溶出し、そして集めたフラクションは1M トリスでpH 3.5に調整した。このようにして製造したIgGはブタ胃粘膜から得られるペプシン (Sigma) で消化した。ペプシンは0.1M グリシン-HCl pH 3.5に溶解させ、そしてIgG溶液に加えた (酵素: IgG 比率 (w/w) 1:100である)。反応混合物は37℃で3時間反転させながらインキュベートし、そして反応は1M ト

リスを加えてpH 8.0に調整することによって停止させた。次いで、ペプシン消化フラクションは0.75M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に調整し、そして50mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 6.0、0.75M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で平衡化したフェニル-5PW (Tosoh) カラムにアプライした。試料は、0.75Mから0Mまでの  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の直線的勾配で溶出した。F(ab')<sub>2</sub>-2は主ピークに含まれていた。

#### ヒト型化抗体の特性解析

ヒト型化C4G1抗体についてマウスおよびキメラ抗体と比較してその性質を検討した。ヒト型化抗体は、キメラ抗体と同様の方法でフルオロサイトメトリー分析した結果HEL 92.1.7細胞と結合し(第4図)、これはヒト型化抗体がGP IIb/IIIa抗原を認識することを示していた。

精製したヒト型化C4G1抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>-2フラグメントは還元し、そしてSDS-PAGEを行った。完全抗体はおおよそその分子量 25kDaおよび50kDaの2つのバンドを示し、そしてFabおよびF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントは約25kDaのダブルットのバンドを示した。ヒト型化C4G1 F(ab')<sub>2</sub>-2フラグメントはSDS-PAGEでF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントと同じ易動性を示した。これらの結果はアミノ酸組成から算出されたL鎖およびH鎖またはH鎖フラグメントの分子量と矛盾しなかった。

ヒト型化C4G1抗体、FabフラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントの親和性はマウスC4G1抗体およびフラグメントとの競合的結合によって測定した。精製したヒト血小板をGP IIb/IIIa抗原の供給源として使用した。血小板は、フィコール-ハイパク (Ficoll-hypaque) での遠心によって正常なヒト提供者から得られるパフィーコートから精製した。競合させるヒト型化またはマウス抗体若しくはフラグメントは量を変えて4.5ngの放射性ヨウ素標識トレーサーC4G1抗体 (3.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) に加え、そして  $3 \times 10^7$  個の血小板と共に0.2mlの改変タイロード緩衝液中室温で1時間インキュベートした。細胞は2mlの氷冷緩衝液で洗浄し、そして遠心しベレット化した。放射活性を測定し、そして結合および遊離トレーサー抗体の濃度を計算した(第8図)。種々の抗体およびフラグメントの結合親和性はQueen等、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989) と同様にして計算した。

この結果は、それぞれヒト型化とマウスのC4G1抗体（第8図A）、ヒト型化とマウスのC4G1 Fabフラグメント（第8図B）、およびヒト型化とマウスのC4G1 F(ab')<sub>2</sub>フラグメント（第8図C）の間の結合親和性に有意な差異のないことを明らかに示している。競合結合実験をGPIIb/IIIa抗原の供給源としてHEL 92.1.7細胞で行い、同じ結果が得られた。更に、これら細胞への実際の結合親和性は全て約 $10^8\text{M}^{-1}$ またはそれ以上であった。

マウスとヒト型化C4G1抗体およびフラグメントが血小板凝集を阻止する能力を測定した。各抗体またはフラグメントは $5\mu\text{g/ml}$ の最終濃度で、新たに採血したクエン酸添加血液を $200\times g$ で10分間遠心して製造した血小板に富む血漿（PRP）に加え、そして $37^\circ\text{C}$ で攪拌し乍ら5分間インキュベートした。ADPは凝集を開始させるため $4.6\mu\text{M}$ の終濃度で加えた。血小板凝集は、シエンコ（Sienco）ニチャンネル凝集計、モデル DP-247FまたはHEMA-TRACERを使用して光透過率によってモニターした。ヒト型化とマウスのC4G1抗体の凝集阻止能力（第9図）またはそれぞれヒト型化とマウスのFabおよび(Fab')<sub>2</sub>-1フラグメントの凝集阻止能力に有意な差異はなかった。そしてヒト型化C4G1 F(ab')<sub>2</sub>-1とF(ab')<sub>2</sub>-2フラグメントの凝集阻止能力に有意な差異はなかった。

マウス及びヒト型化C4G1抗体のヒトさい帯静脈内皮細胞（HUVEC）への結合を、GPIIIaに特異的なマウスモノクローナル抗体B6A3の結合と比較し、調べた。HEL 92.1.7細胞への抗体の結合も調べた。抗体は上述したように放射標識した（ $3.5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ）。 $500\mu\text{l}$  HUVECあるいはHEL 92.1.7（ $2\times 10^4/\text{ml}$ 、 $2\times 10^5/\text{ml}$ 、 $2\times 10^6/\text{ml}$ ）の懸濁液を $1.5\text{ml}$  エッペンドルフチューブ中、室温あるいは $4^\circ\text{C}$ で各モノクローナル抗体の $100\text{fmol}$ と90分間インキュベートした。インキュベーション後、エッペンドルフ遠心チューブ中のシリコンオイルの上へチューブ内容物を移し、室温で2分間、 $10,000g$ で遠心した。ペレットと上清を、ガンマカウンターで別々に測定した。非特異的結合を、100倍量の非標識抗体で測定し、特異的結合を出す為に総結合量から差し引いた。マウス及びヒト型化C4G1モノクローナル抗体が、 $2\times 10^5/\text{ml}$ 、 $2\times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度で、マウスB6A3と同程度にHEL 92.1.7細胞に特異的結合を示した。一方、マウスB6A3は $2\times 10^6/\text{ml}$ でHUVECに特異的に結合したが、マウス及びヒト型化C4G1は、いずれの細胞濃度でもHUVEC

VECに特異的結合を示さなかった。

#### エキスピボのADP誘導血小板凝集阻止活性

サルでヒト型化C4G1 FabとF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのエキスピボ血小板凝集阻止能力を測定した。全て健康なヒト提供者から得られた血小板はヒト型化C4G1に応答するが、ある種のアカゲザルから得られた血小板はヒト型化C4G1に応答しなかった。それ故、ヒト型化C4G1に応答する血小板を有するアカゲザルだけを本実験用を選択した。

各フラグメントは5mlの生理食塩水溶液に懸濁し、そしてアカゲザル（雄、体重2.8～5.0kg）に静脈内に投与した。プラセボ対照では、5mlの生理食塩水溶液を投与した。血液は塩酸ケタミンによる麻酔下で投与1時間後に集め、そして直ちにクエン酸を添加し、そして200gで10分間遠心した。上清液をPRP（多血小板血漿）とした。先血小板血漿（PPP）は、PRPを得た残りの血液を2000gで遠心して調製した。PRPはPPPで希釈して血小板数を $3 \times 10^8$ /mlにした。

凝集を開始させるためADPは20 $\mu$ Mの最終濃度で加えた。血小板凝集は光透過によってモニターした。

ヒト型化C4G1 FabおよびF(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントで処理したサルから得られた血小板で血小板凝集は完全に阻止された。F(ab')<sub>2</sub>-1フラグメントは0.5mg/体重kgの投与量で血小板凝集を完全に阻止した。これらフラグメントでの処理はサルで重篤な血小板減少症を生じさせなかった。

前述のことから、本発明のヒト型化免疫グロブリンは他のGP11b/IIIa特異的抗体を超える多数の利点を提供すると評価されよう。マウスモノクローナル抗体と比較して、本発明のヒト型化免疫グロブリンは実質的により少ない異種アミノ酸配列を含有している。ヒト患者への注射後に抗原性を生じせしめる可能性が減少していることは有意な治療上の改善を示している。

全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願を特にそして個々に指摘して参考として組み入れる場合と同じ程度に本明細書に参考として組み入れる。本発明は明確化および理解の目的で説明および実施例によって幾らか詳細に記載しているが、ある種の変更および修正が請求の範囲の範囲内で実施され

得ることは明白である。



## 請求の範囲

1. 糖タンパク質 GPIIb/IIIa エピトープと特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 免疫グロブリンが2対のL/H鎖二量体からなり、その際各鎖が可変領域および定常領域を含んで成る請求の範囲第1項に記載の組成物。
3. 少なくとも1つの鎖の可変領域が非ヒト免疫グロブリン鎖から得られる3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る請求の範囲第2項に記載の組成物。
4. 免疫グロブリンがFabである請求の範囲第1項に記載の組成物。
5. 免疫グロブリンがF(ab')<sub>2</sub>である請求の範囲第1項に記載の組成物。
6. GPIIb/IIIa タンパク質と特異的に反応するマウスモノクローナル抗体と該タンパク質の結合を阻止し得る実質的に純粋であり、且つマウスモノクローナル抗体から得られる少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成るヒト型化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
7. ヒト型化免疫グロブリンが約 $10^7 M^{-1}$ またはそれより強い結合親和性を示す請求の範囲第1項または6項に記載の組成物。
8. ヒト型化免疫グロブリンが、それぞれマウスモノクローナル抗体から得られる3つのCDRを有する全長のLおよびH鎖を含んで成る請求の範囲第1項または6項に記載の組成物。
9. ヒトフレームワークおよび該フレームワークとは天然には関係のない1つまたはそれ以上の外来相補性決定領域(CDR)を含んで成り、糖タンパク質IIb/IIIaと結合することができる組換え免疫グロブリン組成物。
10. 免疫グロブリンがFabまたはF(ab')<sub>2</sub>である請求の範囲第9項に記載の組成物。
11. 外来CDRの全てが免疫グロブリンのH鎖上に位置している請求の範囲第9項に記載の組成物。
12. 免疫グロブリンがIgG<sub>1</sub>アイソタイプである請求の範囲第9項に記載の組成物。
13. 成熟L鎖およびH鎖可変領域タンパク質配列が第5図A及びBの上部列の

配列と実質的に同じである請求の範囲第9項に記載の組成物。

14. LおよびH鎖がフレームワーク領域及びフレームワーク領域とは異なる免疫グロブリン分子から得られる相補性決定領域(CDR)を含んで成るGP11b/IIIa糖タンパク質上のエпитープと特異的に反応し得るヒト型化免疫グロブリン。

15. 少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ の親和性を有する請求の範囲第14項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

16. アゴニストに応答して起きるヒト血小板の凝集を阻止できる請求の範囲第14項に記載の免疫グロブリン。

17. 血管内皮細胞上にエпитープが存在しないかまたは少ない請求の範囲第14項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

18. ヒト型化免疫グロブリンがFabまたは $F(ab')_2$ である請求の範囲第14、15、16または17項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

19. 2対のL鎖/H鎖二量体を含んで成る請求の範囲第14、15、16または17項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

20. フレームワーク領域が少なくとも2つのヒト免疫グロブリンから得られるアミノ酸配列を含んで成る請求の範囲第14、15、16または17項に記載の免疫グロブリン。

21. CDRがマウス免疫グロブリンから得られる請求の範囲第14、15、16または17項に記載の免疫グロブリン。

22. GP11b/IIIaタンパク質と結合できヒトフレームワーク中においてマウスモノクローナル抗体C4G1から得られる1つまたはそれ以上の相補性決定領域(CDR)を含んで成るヒト型化免疫グロブリン。

23. ヒトフレームワークが $\kappa$ 免疫グロブリンフレームワークと実質的に同じである請求の範囲第22項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

24. 第5図A上部列に示される成熟L鎖可変領域配列および第5図B上部列に示される成熟H鎖可変領域配列を有する請求の範囲第22項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

25. 免疫グロブリンがFabまたは $F(ab')_2$ である請求の範囲第22項または24項に

記載のヒト型化免疫グロブリン。

26. 第5図Cに示される成熟L鎖配列および第5図Dに示される成熟H鎖配列を有する請求の範囲第22項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

27. 請求の範囲第24項または26項に記載のヒト型化免疫グロブリンの酵素消化によって得ることができるヒト型化免疫グロブリン。

28. 免疫グロブリンが $F(ab')_2$ である請求の範囲第27項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

29. 免疫グロブリンがFabである請求の範囲第27項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

30. 免疫グロブリンがIgG<sub>1</sub>アイソタイプである請求の範囲第24項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

31. アゴニストに応答して起きるヒト血小板の凝集を阻止できる請求の範囲第22項または24項に記載のヒト型化免疫グロブリン。

32. ミエローマ細胞中で産生される請求の範囲第14または22項に記載の免疫グロブリン。

33. ヒトフレームワークをコードする第1の配列および1つまたはそれ以上のマウス免疫グロブリンの相補性決定領域(CDR)をコードする第2の配列を含んで成り、発現によって糖タンパク質GP11b/IIIaエピトープと特異的に結合しそしてアゴニスト刺激に応答して起きるヒト血小板の凝集を阻止できる免疫グロブリンが産生させられるポリヌクレオチド。

34. 免疫グロブリンがIgG<sub>1</sub>アイソタイプである請求の範囲第33項に記載のポリヌクレオチド。

35. 免疫グロブリンがFabまたは $F(ab')_2$ である請求の範囲第33項に記載のポリヌクレオチド。

36. 第5図A上部列に示される成熟L鎖可変配列をコードする配列および第5図B上部列に示される成熟H鎖可変配列をコードする配列を含んで成る請求の範囲第33項に記載のポリヌクレオチド。

37. 請求の範囲第33項記載のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

38. 請求の範囲第37項記載の発現ベクターでトランスフェクトされた細胞株。

39. GPIIb/IIIa タンパク質に結合できそしてヒト血小板の凝集を阻止できるヒトフレームワークおよび1つまたはそれ以上のマウス免疫グロブリン相補性決定領域(CDR)を含んで成るヒト型化免疫グロブリンの成熟L鎖または成熟H鎖をコードする配列を含有するポリヌクレオチド。

40. 第5図A上部列に示される成熟L鎖可変領域または第5図B上部列に示される成熟H鎖可変領域をコードする配列を含んで成る請求の範囲第39項に記載のポリヌクレオチド。

41. 第5図Cに示される成熟L鎖をコードする配列または第5図Dに示される成熟H鎖をコードする配列を含んで成る請求の範囲第39項に記載のポリヌクレオチド。

42. 請求の範囲第39項記載のポリヌクレオチドを含んで成る発現ベクター。

43. 請求の範囲第40項記載のポリヌクレオチドを含んで成る請求の範囲第42項に記載の発現ベクター。

44. 請求の範囲第41項記載のポリヌクレオチドを含んで成る請求の範囲第42項に記載の発現ベクター。

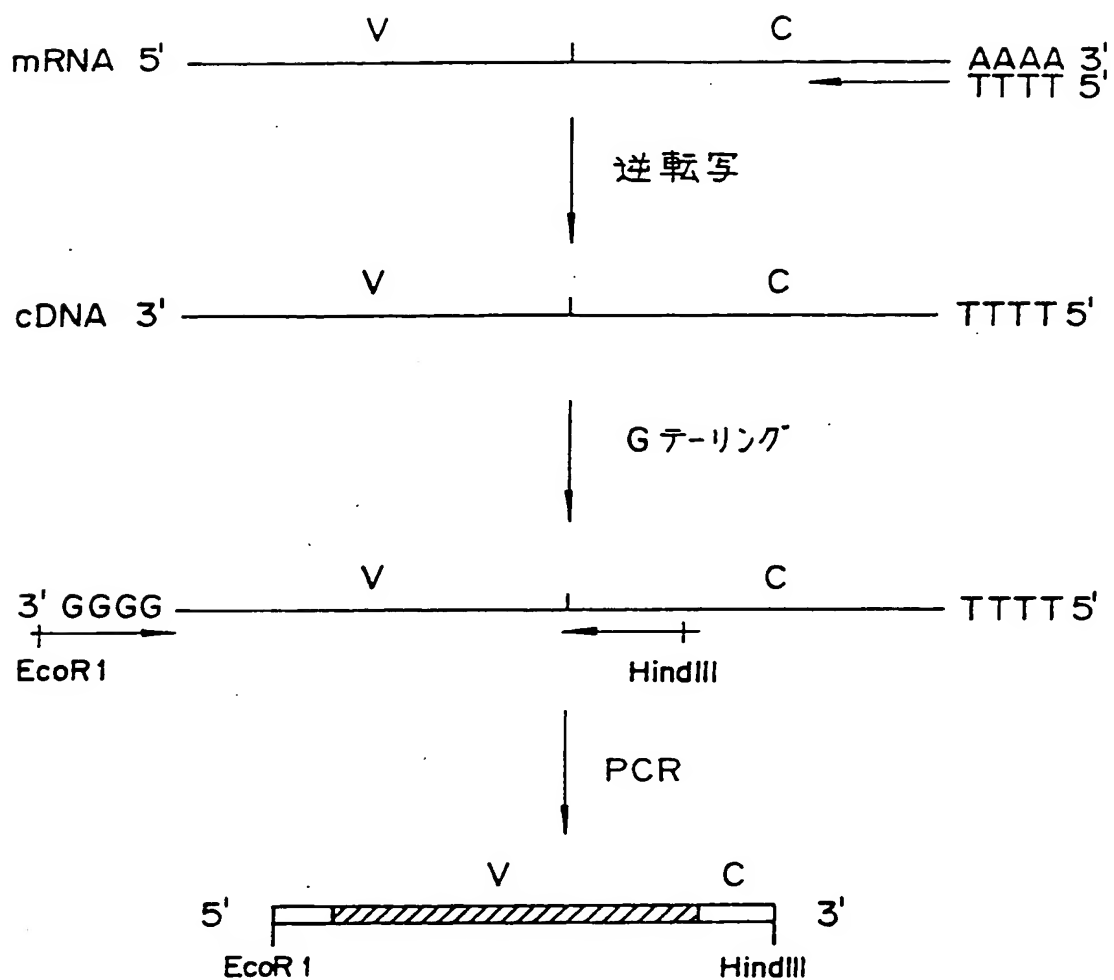
45. 第1のベクターが成熟L鎖をコードする配列を含んで成りそして第2のベクターが成熟H鎖をコードする配列を含んで成る請求の範囲第42項記載の2種類の発現ベクターでトランスフェクトした細胞株。

46. 第1のベクターが第5図A上部列に示されるタンパク質配列をコードする配列を含んで成りそして第2のベクターが第5図B上部列に示されるタンパク質配列をコードする配列を含んで成る請求の範囲第45項に記載の細胞株。

47. 第1のベクターが第5図Cに示されるタンパク質配列をコードする配列を含んで成りそして第2のベクターが第5図Dに示されるタンパク質配列をコードする配列を含んで成る請求の範囲第45項に記載の細胞株。

48. 請求の範囲第14または22項記載のヒト型化免疫グロブリンを含んで成る血栓塞栓性疾患治療剤。

## 第 1 図



## 第2図

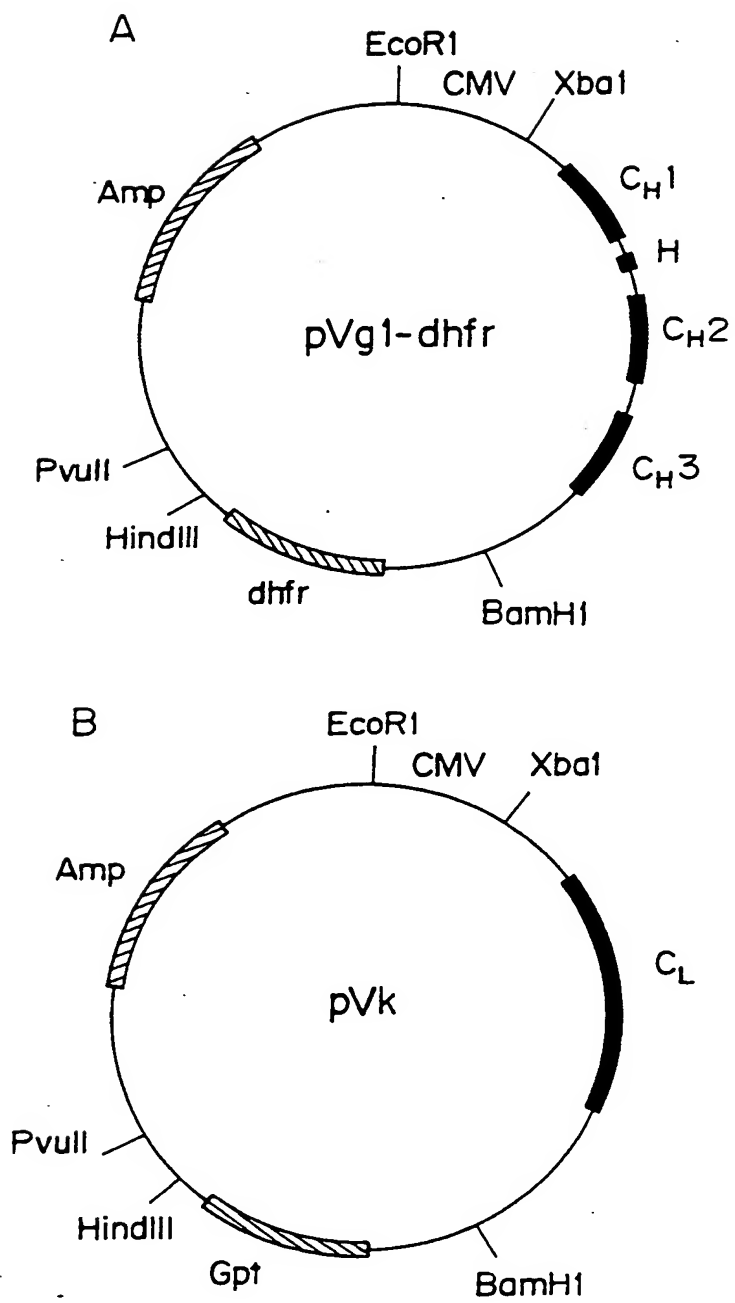
A

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTTTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGT  
M M S S A Q F L G F L L L C F Q G T R C  
GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACC  
D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T  
ATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCA  
I S C R A S O D I N N Y L N W Y Q Q K P  
GATGGAATTGTAAACTCCTGATCTACTACACATCAACATTACACTCAGGAGTCCCATCA  
D G I V K L L I Y Y T S T L H S G V P S  
AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAG  
R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q  
GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGA  
E D I A T Y F C O O G N T L P W T F G G  
GGCACCAAGCTGGAAATCAAA  
G T K L E I K

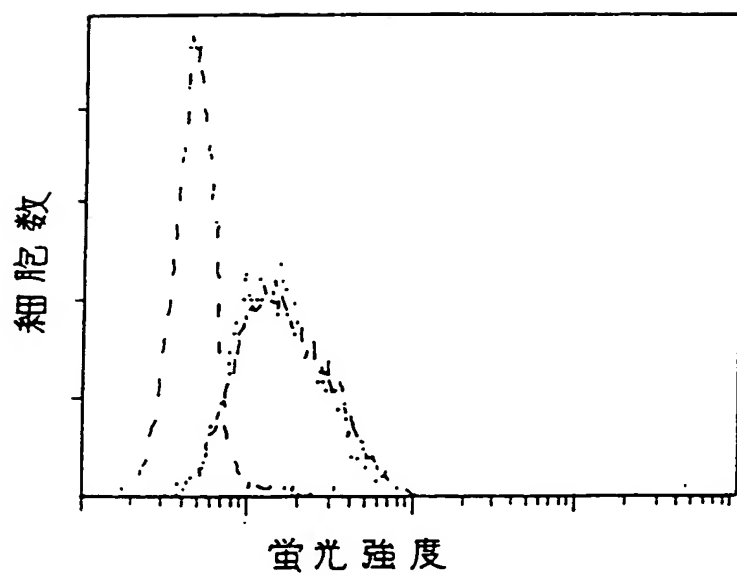
B

ATGGAATGGAGCGGAGTCTTTATCTTTCTTCTGTCAGTGAAGTGTCACTCCCAG  
M E W S G V F I F L L S V T A S V H S Q  
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAGGGCCTGGGACTTCAGTGAGGGTGTCC  
V Q L Q Q S G A E L V G P G T S V R V S  
TGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAATTACTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCT  
C K A S G Y A F T N Y L I E W V K Q R P  
GGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTTATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAAT  
G Q G L E W I G V I Y P G S G G T N Y N  
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACTCTGACTGTAGACAAATCCTCCACCACTGCCTACATG  
E K F K G K A T L T V D K S S T T A Y M  
CAACTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGACGAGATGGT  
Q L S S L T S D D S A V Y F C A R R D G  
AACTACGGATGGTTTGCCTACTGGGGCCGGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA  
N Y G W F A Y W G R G T L V T V S A

第 3 図



第 4 図





## 第5図A

ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	THR	PRO	SER	THR	LEU	SER	ALA	SER	VAL	GLY	ASP	ARG	VAL	THR
ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	<u>THR</u>	THR	SER	SER	LEU	SER	ALA	SER	LEU	GLY	ASP	ARG	VAL	THR
1									10										20
ILE	SER	CYS	ARG	ALA	SER	GLN	ASP	ILE	ASN	ASN	TYR	LEU	ASN	TRP	TYR	GLN	GLN	LYS	PRO
ILE	<u>SER</u>	CYS	<u>ARG</u>	<u>ALA</u>	<u>SER</u>	<u>GLN</u>	<u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>ASN</u>	<u>ASN</u>	<u>TYR</u>	<u>LEU</u>	<u>ASN</u>	TRP	TYR	GLN	GLN	LYS	PRO
21									30										40
GLY	LYS	ALA	PRO	LYS	LEU	LEU	ILE	TYR	TYR	THR	SER	THR	LEU	HIS	SER	GLY	VAL	PRO	SER
ASP	GLY	ILE	VAL	LYS	LEU	LEU	<u>ILE</u>	TYR	<u>TYR</u>	<u>THR</u>	<u>SER</u>	<u>THR</u>	<u>LEU</u>	<u>HIS</u>	<u>SER</u>	GLY	VAL	PRO	SER
41									50										60
ARG	PHE	SER	GLY	SER	GLY	SER	GLY	THR	ASP	TYR	THR	LEU	THR	ILE	SER	SER	LEU	GLN	PRO
ARG	PHE	<u>SER</u>	GLY	SER	GLY	SER	GLY	THR	<u>ASP</u>	<u>TYR</u>	SER	LEU	THR	ILE	SER	ASN	LEU	GLU	GLN
61									70										80
ASP	ASP	PHE	ALA	THR	TYR	PHE	CYS	GLN	GLN	GLY	ASN	THR	LEU	PRO	TRP	THR	PHE	GLY	GLN
GLU	ASP	ILE	ALA	THR	TYR	<u>PHE</u>	CYS	<u>GLN</u>	<u>GLN</u>	<u>GLY</u>	<u>ASN</u>	<u>THR</u>	<u>LEU</u>	<u>PRO</u>	<u>TRP</u>	<u>THR</u>	<u>PHE</u>	<u>GLY</u>	<u>GLY</u>
81									90										100
GLY	THR	LYS	VAL	GLU	VAL	LYS													
GLY	THR	LYS	LEU	GLU	ILE	LYS													
101																			107

## 第5図B

GLN	VAL	GLN	LEU	VAL	GLN	SER	GLY	ALA	GLU	VAL	LYS	LYS	PRO	GLY	SER	SER	VAL	LYS	VAL
GLN	VAL	GLN	LEU	GLN	GLN	SER	GLY	ALA	GLU	LEU	VAL	GLY	PRO	GLY	THR	SER	VAL	ARG	VAL
1									10									20	
SER	CYS	LYS	ALA	SER	GLY	TYR	ALA	PHE	THR	ASN	TYR	LEU	ILE	GLU	TRP	VAL	ARG	GLN	ALA
SER	CYS	LYS	ALA	SER	GLY	<u>TYR</u>	<u>ALA</u>	PHE	<u>THR</u>	<u>ASN</u>	<u>TYR</u>	<u>LEU</u>	<u>ILE</u>	<u>GLU</u>	TRP	VAL	LYS	GLN	ARG
21									30									40	
PRO	GLY	GLN	GLY	LEU	GLU	TRP	ILE	GLY	VAL	ILE	TYR	PRO	GLY	SER	GLY	GLY	THR	ASN	TYR
PRO	GLY	GLN	GLY	LEU	GLU	TRP	<u>ILE</u>	GLY	<u>VAL</u>	<u>ILE</u>	<u>TYR</u>	<u>PRO</u>	<u>GLY</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>GLY</u>	<u>THR</u>	<u>ASN</u>	<u>TYR</u>
41									50									60	
ASN	GLU	LYS	PHE	LYS	GLY	ARG	VAL	THR	LEU	THR	VAL	ASP	GLU	SER	THR	ASN	THR	ALA	TYR
<u>ASN</u>	<u>GLU</u>	<u>LYS</u>	<u>PHE</u>	<u>LYS</u>	<u>GLY</u>	LYS	ALA	THR	<u>LEU</u>	THR	<u>VAL</u>	ASP	LYS	SER	SER	THR	THR	ALA	TYR
61									70									80	
MET	GLU	LEU	SER	SER	LEU	ARG	SER	GLU	ASP	THR	ALA	VAL	TYR	PHE	CYS	ALA	ARG	ARG	ASP
MET	GLN	LEU	SER	SER	LEU	THR	SER	ASP	ASP	SER	ALA	<u>VAL</u>	TYR	PHE	CYS	ALA	<u>ARG</u>	<u>ARG</u>	<u>ASP</u>
81									90									100	
GLY	ASN	TYR	GLY	TRP	PHE	ALA	TYR	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	LEU	VAL	THR	VAL	SER	SER	
<u>GLY</u>	<u>ASN</u>	<u>TYR</u>	<u>GLY</u>	<u>TRP</u>	<u>PHE</u>	<u>ALA</u>	<u>TYR</u>	<u>TRP</u>	<u>GLY</u>	<u>ARG</u>	GLY	<u>THR</u>	LEU	VAL	THR	VAL	SER	ALA	
101									110									119	

## 第5図C

ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	THR	PRO	SER	THR	LEU	SER	ALA	SER	VAL	GLY	ASP	ARG	VAL	THR	1	10	20
ILE	SER	CYS	ARG	ALA	SER	GLN	ASP	ILE	ASN	ASN	TYR	LEU	ASN	TRP	TYR	GLN	GLN	LYS	PRO	21	30	40
GLY	LYS	ALA	PRO	LYS	LEU	LEU	ILE	TYR	TYR	THR	SER	THR	LEU	HIS	SER	GLY	VAL	PRO	SER	41	50	60
ARG	PHE	SER	GLY	SER	GLY	SER	GLY	THR	ASP	TYR	THR	LEU	THR	ILE	SER	SER	LEU	GLN	PRO	61	70	80
ASP	ASP	PHE	ALA	THR	TYR	PHE	CYS	GLN	GLN	GLY	ASN	THR	LEU	PRO	TRP	THR	PHE	GLY	GLN	81	90	100
GLY	THR	LYS	VAL	GLU	VAL	LYS	ARG	THR	VAL	ALA	ALA	PRO	SER	VAL	PHE	ILE	PHE	PRO	PRO	101	110	120
SER	ASP	GLU	GLN	LEU	LYS	SER	GLY	THR	ALA	SER	VAL	VAL	CYS	LEU	LEU	ASN	ASN	PHE	TYR	121	130	140
PRO	ARG	GLU	ALA	LYS	VAL	GLN	TRP	LYS	VAL	ASP	ASN	ALA	LEU	GLN	SER	GLY	ASN	SER	GLN	141	150	160
GLU	SER	VAL	THR	GLU	GLN	ASP	SER	LYS	ASP	SER	THR	TYR	SER	LEU	SER	SER	THR	LEU	THR	161	170	180
LUE	SER	LYS	ALA	ASP	TYR	GLU	LYS	HIS	LYS	VAL	TYR	ALA	CYS	GLU	VAL	THR	HIS	GLN	GLY	181	190	200
LEU	SER	SER	PRO	VAL	THR	LYS	SER	PHE	ASN	ARG	GLY	GLU	CYS							201	210	214

## 第5図D

GLN	VAL	GLN	LEU	VAL	GLN	SER	GLY	ALA	GLU	VAL	LYS	LYS	PRO	GLY	SER	SER	VAL	LYS	VAL	1	10	20
SER	CYS	LYS	ALA	SER	GLY	TYR	ALA	PHE	THR	ASN	TYR	LEU	ILE	GLU	TRP	VAL	ARG	GLN	ALA	21	30	40
PRO	GLY	GLN	GLY	LEU	GLU	TRP	ILE	GLY	VAL	ILE	TYR	PRO	GLY	SER	GLY	GLY	THR	ASN	TYR	41	50	60
ASN	GLU	LYS	PHE	LYS	GLY	ARG	VAL	THR	LEU	THR	VAL	ASP	GLU	SER	THR	ASN	THR	ALA	TYR	61	70	80
MET	GLU	LEU	SER	SER	LEU	ARG	SER	GLU	ASP	THR	ALA	VAL	TYR	PHE	CYS	ALA	ARG	ARG	ASP	81	90	100
GLY	ASN	TYR	GLY	TRP	PHE	ALA	TYR	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	LEU	VAL	THR	VAL	SER	SER	ALA	101	110	120
SER	THR	LYS	GLY	PRO	SER	VAL	PHE	PRO	LEU	ALA	PRO	SER	SER	LYS	SER	THR	SER	GLY	GLY	121	130	140
THR	ALA	ALA	LEU	GLY	CYS	LEU	VAL	LYS	ASP	TYR	PHE	PRO	GLU	PRO	VAL	THR	VAL	SER	TRP	141	150	160
ASN	SER	GLY	ALA	LEU	THR	SER	GLY	VAL	HIS	THR	PHE	PRO	ALA	VAL	LEU	GLN	SER	SER	GLY	161	170	180
LEU	TYR	SER	LEU	SER	SER	VAL	VAL	THR	VAL	PRO	SER	SER	SER	LEU	GLY	THR	GLN	THR	TYR	181	190	200
ILE	CYS	ASN	VAL	ASN	HIS	LYS	PRO	SER	ASN	THR	LYS	VAL	ASP	LYS	LYS	VAL	GLU	PRO	LYS	201	210	220
SER	CYS	ASP	LYS	THR	HIS	THR	CYS	PRO	PRO	CYS	PRO	ALA	PRO	GLU	LEU	LEU	GLY	GLY	PRO	221	230	240
SER	VAL	PHE	LEU	PHE	PRO	PRO	LYS	PRO	LYS	ASP	THR	LEU	MET	ILE	SER	ARG	THR	PRO	GLU	241	250	260
VAL	THR	CYS	VAL	VAL	VAL	ASP	VAL	SER	HIS	GLU	ASP	PRO	GLU	VAL	LYS	PHE	ASN	TRP	TYR	261	270	280
VAL	ASP	GLY	VAL	GLU	VAL	HIS	ASN	ALA	LYS	THR	LYS	PRO	ARG	GLU	GLU	GLN	TYR	ASN	SER	281	290	300
THR	TYR	ARG	VAL	VAL	SER	VAL	LEU	THR	VAL	LEU	HIS	GLN	ASP	TRP	LEU	ASN	GLY	LYS	GLU	301	310	320
TYR	LYS	CYS	LYS	VAL	SER	ASN	LYS	ALA	LEU	PRO	ALA	PRO	ILE	GLU	LYS	THR	ILE	SER	LYS	321	330	340
ALA	LYS	GLY	GLN	PRO	ARG	GLU	PRO	GLN	VAL	TYR	THR	LEU	PRO	PRO	SER	ARG	ASP	GLU	LEU	341	350	360
THR	LYS	ASN	GLN	VAL	SER	LEU	THR	CYS	LEU	VAL	LYS	GLY	PHE	TYR	PRO	SER	ASP	ILE	ALA	361	370	380
VAL	GLU	TRP	GLU	SER	ASN	GLY	GLN	PRO	GLU	ASN	ASN	TYR	LYS	THR	THR	RPO	PRO	VAL	LEU	381	390	400
ASP	SER	ASP	GLY	SER	PHE	PHE	LEU	TYR	SER	LYS	LEU	THR	VAL	ASP	LYS	SER	ARG	TRP	GLN	401	410	420
GLN	GLY	ASN	VAL	PHE	SER	CYS	SER	VAL	MET	HIS	GLU	ALA	LEU	HIS	ASN	HIS	TYR	THR	GLN	421	430	440
LYS	SER	LEU	SER	LEU	SER	PRO	GLY	LYS												441	449	

## 第6図

rh29

TATATCTAGA CCACCATGGG ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCCTCCTGTC AGGTACCGCG  
GGCGTGCACT CTCAGGTCCA GCTTGTCCAG TCTGGCGCTG AAGTCAAGAA ACC

rh30

TATAGAATTC TCGAGACCCT GTCCAGGGGC CTGCCTTACC CACTCTATCA AGTAATTAGT  
AAAGGCGTAG CCAGAAGCTT TGCAGGAGAC CTTACGGAG CTCCCAGGTT TCTTGACTTC  
AGC

rh31

TATAGAATTC TCGAGTGGAT TGGAGTGATT TATCCTGGAA GTGGTGGTAC TAACTACAAT  
GAGAAGTTCA AGGGCCGTGT TAACTGACA GTAGACGAAT CCACCAATAC AGCCTACATG  
GAACTGAGCA GCCTGAGATC A

rh32

TATATCTAGA GGTTTTAAGG ACTCACCTGA GGAGACTGTG ACCAGGGTTC CTTGGCCCCA  
GTAGGCAAAC CATCCGTAGT TACCATCTCG TCTTGCACAG AAATAGACTG CAGTGTCTC  
TGATCTCAGG CTGCTCA

rh33

TATATCTAGA CCACCATGGA GACCGATACC CTCCTGCTAT GGGTCCTCCT GCTATGGGTC  
CCAGGATCAA CCGGAGATAT TCAGATGACC CAGACTCCGT CGACCCTCTC TGCTAGC

rh34

TATAAAGCTT GGGAGCTTTG CCTGGCTTCT GCTGATACCA GTTTAAATAA TTGTTAATGT  
CCTGACTTGC CCTGCAACTT ATGGTGACCC TATCCCCGAC GCTAGCAGAG AGGGTCG

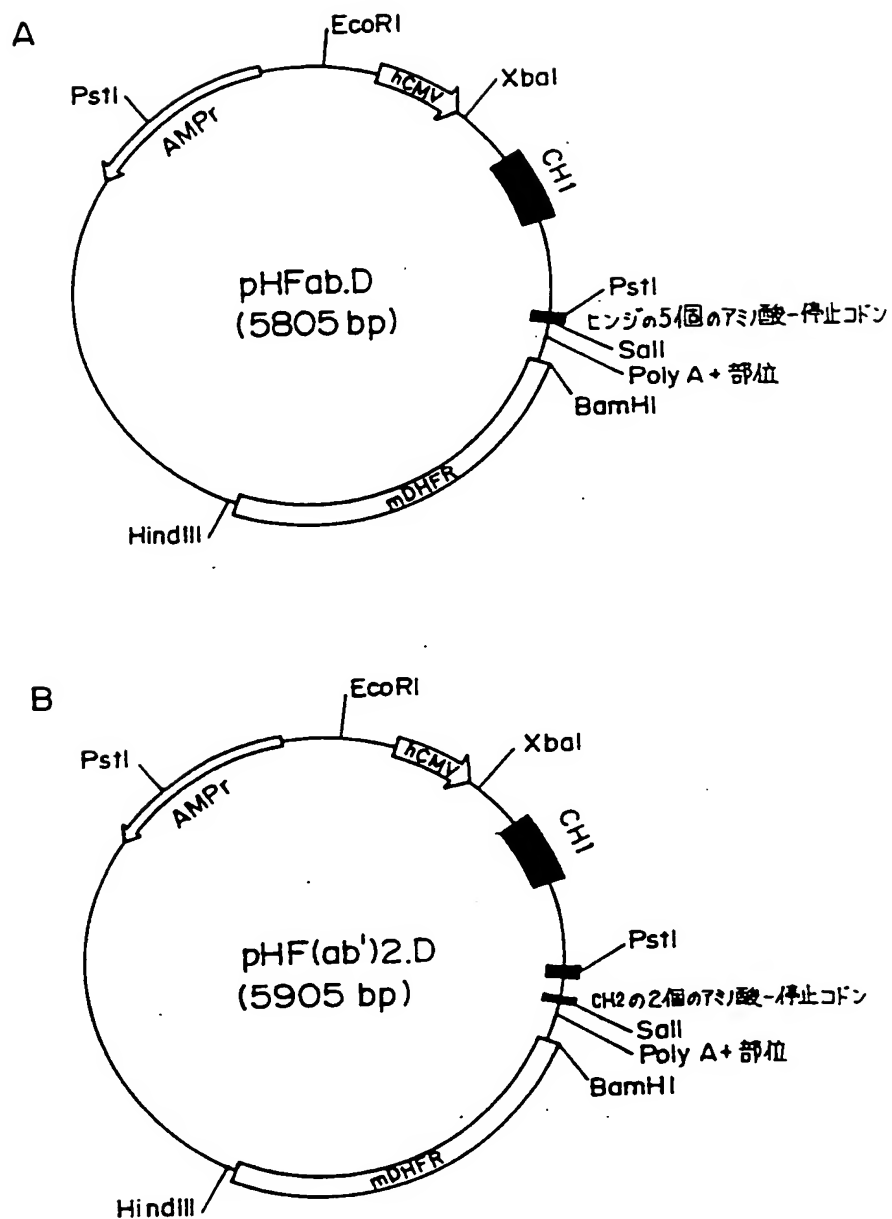
rh35

TATAAAGCTT CTAATTTATT ACACATCAAC ATTAACTCA GGGGTACCTT CACGCTTCAG  
TGGCAGTGGG TCTGGGACCG ATTATACCCT CACAATCTCG AGTCTGCAGC CAGATGA

rh36

TATATCTAGA GCAAAAGTCT ACTTACGTTT GACCTCCACC TTGGTCCCCT GACCGAACGT  
CCACGGAAGC GTATTACCCT GTTGGCAAAA ATAAGTGGCG AAATCATCTG GCTGCAGACT

## 第 7 図



## 第7図C

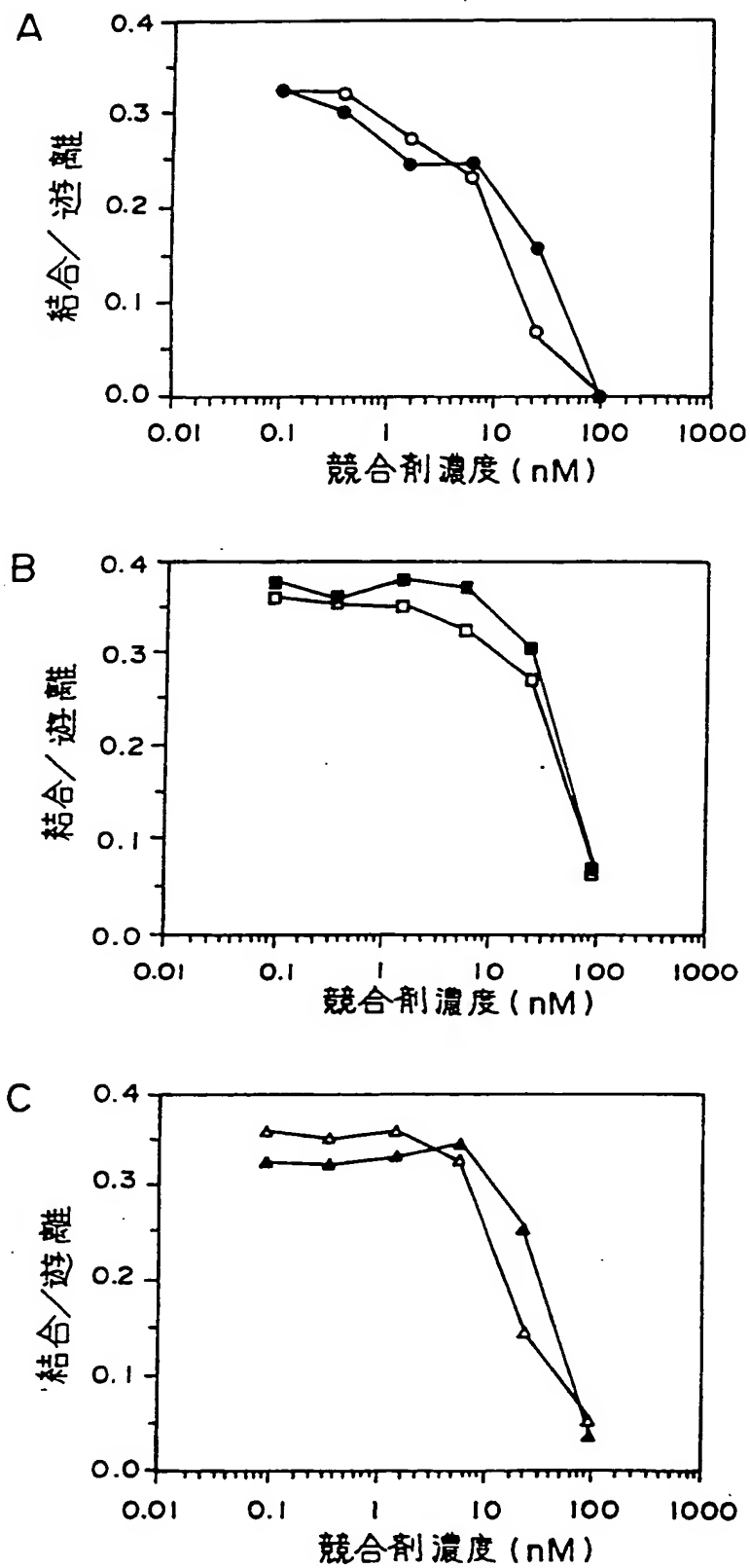
GLN VAL GLN LEU VAL GLN SER GLY ALA	GLU VAL LYS LYS PRO GLY SER SER VAL LYS VAL	
1	10	20
SER CYS LYS ALA SER GLY TYR ALA PHE	THR ASN TYR LEU ILE GLU TRP VAL ARG GLN ALA	
21	30	40
PRO GLY GLN GLY LEU GLU TRP ILE GLY	VAL ILE TYR PRO GLY SER GLY GLY THR ASN TYR	
41	50	60
ASN GLU LYS PHE LYS GLY ARG VAL THR	LEU THR VAL ASP GLU SER THR ASN THR ALA TYR	
61	70	80
MET GLU LEU SER SER LEU ARG SER GLU	ASP THR ALA VAL TYR PHE CYS ALA ARG ARG ASP	
81	90	100
GLY ASN TYR GLY TRP PHE ALA TYR TRP	GLY GLN GLY THR LEU VAL THR VAL SER SER ALA	
101	110	120
SER THR LYS GLY PRO SER VAL PHE PRO	LEU ALA PRO SER SER LYS SER THR SER GLY GLY	
121	130	140
THR ALA ALA LEU GLY CYS LEU VAL LYS	ASP TYR PHE PRO GLU PRO VAL THR VAL SER TRP	
141	150	160
ASN SER GLY ALA LEU THR SER GLY VAL	HIS THR PHE PRO ALA VAL LEU GLN SER SER GLY	
161	170	180
LEU TYR SER LEU SER SER VAL VAL THR	VAL PRO SER SER SER LEU GLY THR GLN THR TYR	
181	190	200
ILE CYS ASN VAL ASN HIS LYS PRO SER	ASN THR LYS VAL ASP LYS LYS VAL GLU PRO LYS	
201	210	220
SER CYS		
221 222		

## 第7図D

GLN VAL GLN LEU VAL GLN SER GLY ALA	GLU VAL LYS LYS PRO GLY SER SER VAL LYS VAL	
1	10	20
SER CYS LYS ALA SER GLY TYR ALA PHE	THR ASN TYR LEU ILE GLU TRP VAL ARG GLN ALA	
21	30	40
PRO GLY GLN GLY LEU GLU TRP ILE GLY	VAL ILE TYR PRO GLY SER GLY GLY THR ASN TYR	
41	50	60
ASN GLU LYS PHE LYS GLY ARG VAL THR	LEU THR VAL ASP GLU SER THR ASN THR ALA TYR	
61	70	80
MET GLU LEU SER SER LEU ARG SER GLU	ASP THR ALA VAL TYR PHE CYS ALA ARG ARG ASP	
81	90	100
GLY ASN TYR GLY TRP PHE ALA TYR TRP	GLY GLN GLY THR LEU VAL THR VAL SER SER ALA	
101	110	120
SER THR LYS GLY PRO SER VAL PHE PRO	LEU ALA PRO SER SER LYS SER THR SER GLY GLY	
121	130	140
THR ALA ALA LEU GLY CYS LEU VAL LYS	ASP TYR PHE PRO GLU PRO VAL THR VAL SER TRP	
141	150	160
ASN SER GLY ALA LEU THR SER GLY VAL	HIS THR PHE PRO ALA VAL LEU GLN SER SER GLY	
161	170	180
LEU TYR SER LEU SER SER VAL VAL THR	VAL PRO SER SER SER LEU GLY THR GLN THR TYR	
181	190	200
ILE CYS ASN VAL ASN HIS LYS PRO SER	ASN THR LYS VAL ASP LYS LYS VAL GLU PRO LYS	
201	210	220
SER CYS ASP LYS THR HIS THR CYS PRO	PRO CYS PRO ALA PRO GLU	
221	230	235

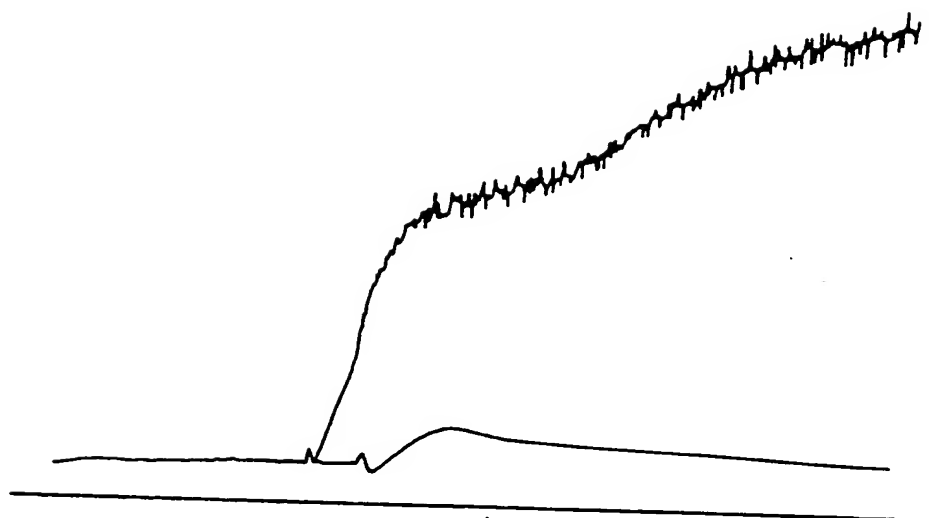


## 第 8 図

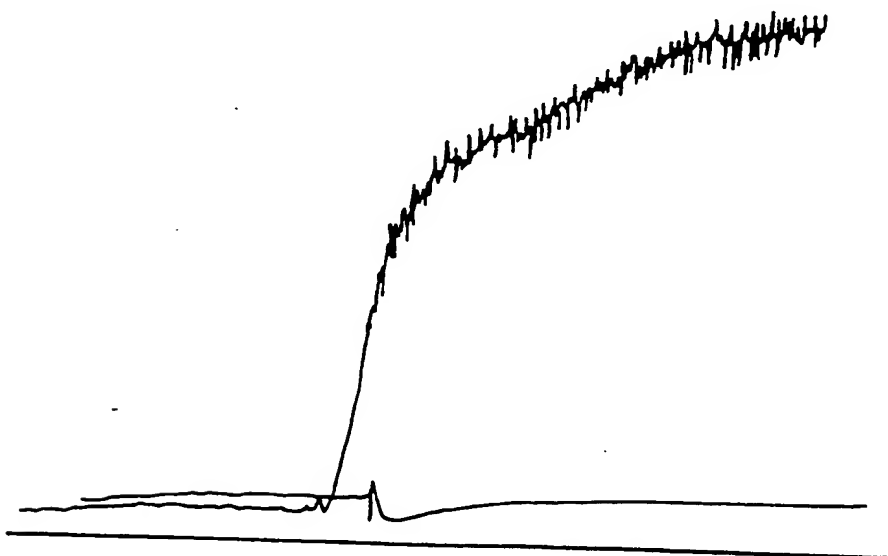


第 9 図

A



B



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP92/01630

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>5</sup> C07K15/28, C12P21/02, 21/08, C12N5/10, 15/13,  
A61K39/395// (C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>5</sup> C07K15/28, C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N5/10, 15/13,  
A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Thrombosis Research, Vol. 38, No. 5, (1985), D. Heinrich et al. "Monoclonal antibodies against human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa 2. Different effects on Platelet function." p. 547-559	1-48
Y	Blood, Vol. 68, No. 3, (1986), B. S. Collier et al. "Artithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model." p. 783-786	1-48
Y	Blood, Vol. 70, No. 1, (1987), D. J. Nugent et al. "A human monoclonal autoantibody recognizes a neoantigen on glycoprotein IIIa expressed on stored and activated platelets." p. 16-22	1-48
Y	Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, No. 20, (1983), D. Pidard et. al. "Interaction of AP-2,	1-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 3, 1993 (03. 03. 93)

Date of mailing of the international search report

March 23, 1993 (23. 03. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP92/01630

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex, with intact platelets" p. 12582-12586	
Y	Journal of Clinical Investigation, Vol. 72, No. 1, (1983), B. S. Coller et al. "A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen of platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa" p. 325-338	1-48
Y	JP, A, 62-296890 (Glegory Poll Winter), December 24, 1987 (24. 12. 87), & EP, A2, 239400 & GB, A, 2188638	1-48
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., Vol. 86, No. 24, (1989), C. Queen et al. "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor" p. 10029-10033	1-48
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., Vol. 88, No. 7, (1991), M. S. Co et al. "Humanized antibodies for antiviral therapy" p. 2869-2873	1-48

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.<sup>8</sup> C07K15/28, C12P21/02, 21/08, C12N5/10, 15/13, A61K39/395 (C12P21/02, C12R1:91)</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.<sup>8</sup> C07K15/28, C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N5/10, 15/13, A61K39/395</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS PREVIEWS</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Thrombosis Research, 第38巻, 第5号, (1985), D.Heinrich et al. "Monoclonal antibodies against human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa 2 Different effects on Platelet function," p. 547-559</td> <td>1-48</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Blood, 第68巻, 第3号, (1986), B.S. Coller et al. "Anti-thrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa</td> <td>1-48</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	Thrombosis Research, 第38巻, 第5号, (1985), D.Heinrich et al. "Monoclonal antibodies against human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa 2 Different effects on Platelet function," p. 547-559	1-48	Y	Blood, 第68巻, 第3号, (1986), B.S. Coller et al. "Anti-thrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa	1-48
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
Y	Thrombosis Research, 第38巻, 第5号, (1985), D.Heinrich et al. "Monoclonal antibodies against human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa 2 Different effects on Platelet function," p. 547-559	1-48									
Y	Blood, 第68巻, 第3号, (1986), B.S. Coller et al. "Anti-thrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa	1-48									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>03.03.93</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>23.03.93</p>									
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号100</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>内 田 俊 生</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 4 B 8 2 1 4 3 4 4 9</p>									

## C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	receptor in an experimental animal model. * p. 783-786	
Y	Blood. 第70巻, 第1号, (1987), D.J.Nugent et al. "A human monoclonal autoantibody recognizes a neoantigen on glycoprotein IIIa expressed on stored and activated platelets." p. 16-22	1-48
Y	Journal of Biological Chemistry, 第258巻, 第20号, (1983), D.Pidard et al. "Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex with intact platelets" p. 12582-12586	1-48
Y	Journal of Clinical Investigation, 第72巻, 第1号, (1983), B.S.Ooller et al. "A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa" p. 325-338	1-48
Y	JP, A, 62-296890 (グレゴリー ポール ウインター), 24. 12月. 1987 (24. 12. 87) &EP, A2, 239400 &GB, A, 2188638	1-48
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 第86巻, 第24号, (1989), O.Queen et al. "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor" p. 10029-10033	1-48
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 第88巻, 第7号, (1991), M.S.Co et al. "Humanized antibodies for antiviral therapy" p. 2869-2873	1-48